
Qualifizierungskonzepte und Qualitätsaspekte bei kapillarelektrophoretischen Proteinbestimmungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Claudia Filomena Cianiulli

aus Hannover

1. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
3. Referentin.	Professorin Dr. Maria Kristina Parr
eingereicht am:	09.10.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	25.02.2014
Druckjahr 2014	

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen

- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Infrared-based temperature measurements in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 2011, 32, 1530–1536
- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Analytical Instrument Qualification in Capillary Electrophoresis*, Electrophoresis 2012, 33, 1499-1508
- Meyer, C., Seiler, P., Bies, C., Cianciulli, C., Wätzig, H., Meyer, V. R., *Minimum Required Signal-to-Noise Ratio for Optimal Precision in HPLC and CE*, Electrophoresis 2012, 33, 1509-1516
- Cianciulli, C., Hahne, T., Wätzig, H., *Capillary Gel Electrophoresis for Precise Protein Quantitation*, Electrophoresis 2012, 33, 3276-3280

Tagungsbeiträge

- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Analytical Instrument Qualification in Capillary Electrophoresis*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2009 in Jena
- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Infrared Thermometry for Analytical Instrument Qualification in Capillary Electrophoresis*, (Poster) Drug Analysis 2010 in Antwerpen, Belgien
- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Infrared Thermometry in Capillary Electrophoresis*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010 in Braunschweig
- Cianciulli, C., Schlüter, H., Minárik, M., Wätzig, H., *Capillary Isoelectric Focusing for Protein Analysis: Low-molecular-mass *pI* markers as Internal Standards*, (Poster) Proteomic Forum 2011 in Berlin

-
- Cianciulli, C., Wätzig, H., *Infrared-based Temperature Measurements for thorough Analytical Instrument Qualification in Capillary Electrophoresis*, (Poster) 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011) in Budapest, Ungarn
 - Cianciulli C., Wätzig H., *Qualification in Capillary Electrophoresis*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2011 in Innsbruck, Österreich
 - Cianciulli, C., Wätzig, H., *Analysis of Proteins with Capillary Gel Electrophoresis: Fabulous Precision*, (Vortrag) Symposium der Fachgruppe für Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik 2011 in Innsbruck, Österreich
 - Cianciulli C., Wätzig H., *Qualifizierung von analytischen Instrumenten – Ein Konzept für die Kapillarelektrophorese*, (Vortrag) CE Forum 2011 in Regensburg
 - Cianciulli C., Deng X., Hahne T., Wätzig H., *The Fabulous Possibilities of Capillary Gel Electrophoresis To Analyse Proteins*, (Poster) 28th International Symposium on MicroScale Bioseparations (MSB 2012) 2012 in Genf, Schweiz

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Hermann Wätzig angefertigt, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die Überlassung des Themas und die interessanten Diskussionen während der Bearbeitung danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Ingo Ott für die Übernahme des Korreferats.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima. Insbesondere gilt mein Dank meinen Arbeitskreiskollegen Sabine Redweik, Sandra Grotefend, Thomas Hahne, Tobias Rakow, Sascha Kühne, Dr. Xi Deng, Dr. Lukas Kaminski, Dr. Heidi Köppel, Dr. Simone Schröder und Dr. Sami El Deeb für die tolle Zusammenarbeit, die fachliche Unterstützung und die angeregten Diskussionen. Anna Jorzak, Jan Harbecke, Franziska Steinicke, Donia El Fahem und K. Jorrit Maul danke ich, die mich im Rahmen ihrer Wahlpflichtfacharbeiten bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Besonderen gilt mein Dank Frank Roesse für die technische Unterstützung.

Dr. Johann Grünefeld, Dr. Inis Winde, Dr. Jan Dreher, Dr. Xi Deng, Katharina Schuller, Désirée Baumann, Luciano Oehninger, Marion Wiggermann, Claudia Schmidt und Shanteya Balasupramaniam danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Hans-Otto Burmeister, Dr. Stefanie Ludewig, Janina Nolte, Daphny Kaminski und Petra Reich sowie allen bereits genannten Personen, die mit mir im ersten und zweiten Stock des Neubaus gearbeitet haben, für die anregenden und erheiternden Diskussionen in Raum 161.

Besonders großer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mich in allen Lebenslagen uneingeschränkt unterstützt hat. Danken möchte ich auch Dr. Kai Städing für sein offenes Ohr, seine Ermutigungen und seine Unterstützung.

Symbole

a	Punktschätzung für das Absolutglied / y-Achsenabschnitt
A	Peakfläche [IE]
$A(\lambda)$	Absorption bei der Wellenlänge λ
b	Punktschätzung für den Steigungsparameter
c	molare Konzentration des Analyten [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
C	Konstante, bestehend aus $\epsilon_0 \epsilon_r \zeta$
D	Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
d	Schichtdicke [cm]
E	Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]
e_0	elektrische Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
e_i	zufälliger Fehler
\hat{e}_i	geschätzter Fehler
f	Freiheitsgrad
F_B	Beschleunigungskraft [N]
$F_{\text{Prüf}}$	Prüfwert eines F-Testes
F_R	Reibungskraft [N]
F_{Tab}	tabellierte Prüfgrenze eines F-Testes
G	elektrischer Leitwert [S]
G_0	elektrischer Leitwert ohne zusätzliche Wärmeeffekte [S]
G_T	elektrischer Leitwert für die zu berechnende Temperatur [S]
H	Signalhöhe
h	Höhe des Basislinienrauschens
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
I	Stromstärke [A]
I_0	Lichtintensität des Referenzstrahles
I_P	Lichtintensität des Probenstrahles
k_B	Boltzmann-Konstante [$1,380 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$]
L_{eff} oder l	effektive Kapillarlänge [m]
L_{tot} oder L	totale Kapillarlänge [m]
M_r	absolute Molekularmasse [Da]
N	theoretische Trennstufe
n	Anzahl
P	Leistung [W]

p	Druck [Pa] oder [bar]
Q_{eff}	effektive Ladungszahl des Teilchens i [$A \cdot s$]
R	Widerstand [Ω]
r	Kapillarinnenradius [m]
R_{eff}	Radius des Teilchens i in wässriger Lösung [m]
r_h	hydrodynamischer Radius [m]
r_i	Radius des Teilchens i [m]
s_1, s_2	zu vergleichende Varianzen
s^2	Varianz des zufälligen Fehlers einer linearen Regression
s_a^2	Varianz des y-Achsenabschnitts a
s_b^2	Varianz der Steigung b
T	Temperatur [K, °C]
t	Zeit [s]
T_0	Temperatur ohne Anlegen einer Spannung [°C]
$T_{\text{Außenwand}}$	Temperatur, gemessen an der Außenwand einer Kapillare [°C]
T_{centre}	zentrale Temperatur [°C]
t_{eof}	Migrationszeit des EOF-Markers [s]
t_i	Migrationszeit des Teilchens i [s]
T_{mean}	mittlere Temperatur [°C]
$t_{\text{Prüf}}$	Prüfwert eines t-Testes
t_s	Migrationszeit Probesubstanz [s]
T_{set}	eingestellte Temperatur [°C]
t_{Tab}	tabellierte Prüfgrenze eines t-Testes
U	Spannung [V]
V	Volumen [m^3]
\dot{V}	Volumenflussrate [$m^3 \cdot s^{-1}$]
v_d	experimentelle Migrationsgeschwindigkeit des Teilchens i [$m \cdot s^{-1}$]
v_{EOF}	elektroosmotische Geschwindigkeit [$m \cdot s^{-1}$]
v_i	Migrationsgeschwindigkeit des Teilchens i [$m \cdot s^{-1}$]
\bar{x}	Mittelwert der x -Werte
x, \hat{y}	Wertepaar mit definiertem x und geschätzten \hat{y}
x_i, y_i	Wertepaar
z_i	Ladungszahl des Teilchens i
α	Absorption
α	Absolutglied / y-Achsenabschnitt
α	Faktor des Temperaturanstiegs
β	Steigungsparameter

γ	thermischer Koeffizient der elektrischen Leitfähigkeit
Δp	Druckdifferenz [Pa] oder [bar]
δT	systematischer Fehler der Temperaturkontrolle [°C]
ε	Emissionsgrad
ε_0	Permittivität des Vakuums ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$)
ε_i	molarer Absorptionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
ε_r	relative Permittivität
ζ	Zetapotential [V]
η	dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]
κ	Leitfähigkeit [$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$]
λ	Wärmeleitfähigkeit [$\text{W} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$]
μ_{app}	experimentelle Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
μ_{eff}	effektive, elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
μ_{EOF}	Mobilität des elektroosmotischen Flusses [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
μ_i	elektrophoretische Mobilität des Teilchens i [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
ρ	Reflexion
τ	Transmission
$\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2$	Gesamtvarianz
$\hat{\sigma}_i^2$	Varianz der Serie i

Abkürzungen

AIQ	Analytical Instrument Qualification (Qualifizierung analytischer Instrumente)
AK	Akzeptanzkriterium
BGE	background electrolyt (Hintergrundelektrolyt)
CA	Carrier ampholytes (Trägerampholyte)
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CGE	Capillary gel electrophoresis (Kapillargelelektrophorese)
CIEF	Capillary isoelectric focusing (kapillarisoelektrische Fokussierung)
cPQ	continuous Performance Qualification (kontinuierliche Leistungsqualifizierung)
CZE	capillary zone electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
DAD	Diodenarray-Detektor
DQ	Design Qualification (Entwurfsqualifizierung)
DTT	DL-Dithiothreitol
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Europäische Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln)
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
EOF	Elektroosmotischer Fluss (electoosmotic flow)
EPO	Erythropoietin
FASI	field-amplified sample injection
FASS	field-amplified sample stacking
FDA	Federal Drug Administration
GLP	Good Laboratory Practice (Gute Laborpraxis)
HEC	Hydroxyethylcellulose
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
iCIEF	Imaged capillary isoelectric focusing (abbildende, kapillarisoelektrische Fokussierung)
id	inner diameter (Innendurchmesser)
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IEP	Isoelektrischer Punkt (pI)
IQ	Installation Qualification (Installierungsqualifizierung)
IR	Infrarot
IS	Interner Standard
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
LOD	Limit of detection (Detektionsgrenze)
LOQ	Limit of quantitation (Bestimmungsgrenze)
LPA	lineares Polyacrylamid
LVSS	large-volume sample stacking
MS	Massenspektrometrie
MTR	migration time ratio (Migrationszeitenverhältnis)
od	outer diameter (Außendurchmesser)
OQ	Operational Qualification (Funktionsqualifizierung)
PAR	peak area ratio (Peakflächenverhältnis)
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PQ	Performance Qualification (Leistungsqualifizierung)
RSD%	Relative standard deviation [%] (relative Standardabweichung)
S/N	Signal-to-noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SOP	Standard operating procedure (Standardarbeitsanweisung)
SST	System Suitability Test (Systemeignungstest)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
URS	User requirement specifications (Lastenheft)
USP	The United States Pharmacopoeia (US-amerikanische Arzneibuch)
WCID	Whole column imaging detector (Detektor für die gesamte Kapillare)

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Danksagung	III
Symbole.....	V
Abkürzungen.....	VIII
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Kapillarelektrophorese (CE)	4
2.1.1 CE-Systeme.....	5
2.1.2 Kapillaren	6
2.1.2.1 Beschichtungen.....	8
2.1.3 Detektion.....	9
2.1.3.1 Empfindlichkeit und Signal-Rausch-Verhältnis	10
2.1.4 Injektion.....	12
2.1.4.1 Hydrodynamische Injektion	13
2.1.4.2 Elektrokinetische Injektion.....	14
2.1.4.3 Andere Injektionsarten	15
2.2 Trennprinzip	15
2.2.1 Elektrophoretische Mobilität	15
2.2.2 Elektroosmotischer Fluss	17
2.2.3 Entstehung von Joulescher Wärme.....	20
2.3 Kapillaronenelektrophorese (CZE).....	24
2.3.1 Einleitung	24
2.3.2 Trennung nach Mobilitäten	24
2.3.3 Konzentrierung von Analyten in der Kapillare.....	25
2.4 Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF)	26
2.4.1 Einleitung	26
2.4.2 Trennung nach isoelektrischen Punkten.....	26
2.4.3 Isoelektrische Fokussierung in der Gel- und der Kapillarelektrophorese.....	28
2.4.4 Anwendungen	28
2.5 Kapillargelelektrophorese (CGE).....	28

2.5.1	Einleitung	28
2.5.2	Gegenüberstellung von Gelelektrophorese und Kapillarelektrophorese.....	29
2.5.3	Permanente und austauschbare Gele	30
2.6	Einsatz von Internen Standards in der Kapillarelektrophorese.....	31
2.7	Einsatz der Kapillarelektrophorese im Arzneibuch.....	33
3	Temperaturmessung an der Kapillare	36
3.1	Temperaturmessung im Infrarotbereich.....	37
3.2	Einbau des IR-Thermometers	40
3.2.1	Einbau in die PrinCE 550 CE	41
3.2.2	Einbau in die Agilent 1600 CE.....	42
3.3	Datenauswertung	42
3.4	Vergleich unterschiedlicher Kapillaren.....	44
3.4.1	Statistische Analyse und Vergleich der linearen Regressionsparameter	45
3.4.1.1	Varianzen der linearen Regressionsparameter.....	46
3.4.1.2	F-Test	47
3.4.1.3	Welch-t-Test.....	47
3.4.1.4	Interpretation	48
3.5	Optimierung des Abstandes	49
3.6	Vergleich unterschiedlicher Techniken zur Temperaturmessung.....	50
3.6.1	Bestimmung der Temperatur aus dem elektrischen Leitwert	52
3.6.2	Berechnung der Temperatur aus dem Anstieg der Stromstärke	53
3.6.3	Berechnung der Temperatur aus der elektroosmotischen Geschwindigkeit.....	55
3.6.4	Das Ergebnis des Vergleiches	56
3.7	Vergleich von verschiedenen Kühlungssystemen.....	60
3.8	Allgemeiner Test zur Überprüfung des Kühlungssystems von CE-Geräten	63
3.9	Fazit	65
4	Qualifizierung analytischer Instrumente – Ein Konzept für die Kapillarelektrophorese	68
4.1	Begriffe und Definitionen nach General Chapter <1058> des USPs.....	69
4.1.1	Die vier Abschnitte der Analytical Instrument Qualification	70
4.1.1.1	Design Qualification	71
4.1.1.2	Installation Qualification	72
4.1.1.3	Operational Qualification	73
4.1.1.4	Performance Qualification	73

4.1.2	Kategorisierung von analytischen Instrumenten	74
4.2	Entwicklung einer Parameterliste für die Kapillarelektrophorese.....	75
4.2.1	Temperatur	79
4.2.2	Spannung.....	80
4.2.3	Detektor	83
4.2.4	Injektion.....	86
4.2.5	Ergebnisse der Qualifizierung	89
4.3	Holistische Qualifizierung	92
4.4	Informationen aus Systemtauglichkeitstests für die Qualifizierung.....	93
4.5	Fazit	96
5	Kapillarisoelektrische Fokussierung.....	98
5.1	Aktueller Stand.....	98
5.1.1	Präzision von Peakflächen und Migrationszeiten.....	99
5.2	Marker für isoelektrische Punkte	99
5.2.1	Substituierte Aminomethylphenole	99
5.2.2	Interner Standard	100
5.2.3	Charakterisierung der pH-Gradienten.....	103
5.2.3.1	Leave-one-out-Experiment.....	104
5.3	Cohn-Fraktion IV-4.....	106
5.3.1	Optimierung der Methode.....	106
5.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	108
6	Kapillargelelektrophorese für präzise Proteinquantifizierung	109
6.1	Proteinanalytik in der pharmazeutischen Industrie	109
6.2	Methodentransfer und –optimierung.....	109
6.3	Vergleich von verschiedenen Injektionsarten.....	113
6.3.1	F-Test	115
6.3.2	Welch-t-Test.....	116
6.3.3	Interpretation.....	117
6.4	Linearitätsmessung	118
6.5	Abhängigkeit der Präzision vom Signal-Rausch-Verhältnis	120
6.6	Bestimmung von Molekülmassen	122
6.7	Möglichkeiten für die Qualitätskontrolle	123
6.8	Zusammenfassung.....	125

7	Zusammenfassung der Arbeit.....	126
8	Experimenteller Teil	129
8.1	Instrumente	129
8.2	Software.....	129
8.2.1	Datenauswertung	131
8.3	Temperaturmessung an der Kapillare	133
8.3.1	Ausrüstung und Materialien.....	133
8.3.2	Puffer- und Probenherstellung.....	133
8.3.3	Methoden	134
8.3.4	Bestimmung des Emissionsgrades von Kapillaren	135
8.4	Qualifizierung analytischer Instrumente.....	136
8.4.1	Materialien	136
8.4.2	Puffer- und Probenherstellung.....	136
8.4.3	Methoden	137
8.4.3.1	Gerätetest	137
8.4.3.2	Prüfung auf Wellenlängenrichtigkeit ohne Diodenarraydetektor	137
8.5	Kapillarisoelektrische Fokussierung	138
8.5.1	Materialien	138
8.5.2	Puffer- und Probenherstellung.....	139
8.5.3	Methode	140
8.6	Kapillargelelektrophorese	140
8.6.1	Materialien	140
8.6.2	Puffer- und Probenherstellung.....	141
8.6.3	Methode	142
9	Literatur.....	144
10	Anhang.....	153
10.1	Temperaturmessung an der Kapillare	153
10.1.1	Matlab-Quellcode	153
10.1.1.1	temperkenn	153
10.1.1.2	Temperaturmessung	154
10.1.1.3	Vergleich von linearen Zusammenhängen	155

10.2	Qualifizierung von analytischen Instrumenten – Ein Konzept für die Kapillarelektrophorese	159
10.2.1	Wellenlängenrichtigkeit	159
10.3	Kapillargelelektrophorese	159
10.3.1	Methodentransfer und –optimierung.....	159
10.3.2	Vergleich von verschiedenen Injektionsarten	163
10.3.3	Abhängigkeit der Präzision vom Signal-Rausch-Verhältnis	164
11	Lebenslauf	165

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Seit der ersten Trennung von Pferdeserum in einem elektrischen Feld vor 75 Jahren durch Arne Tiselius hat sich die Elektrophorese weiterentwickelt und mit der Kapillarelektrophorese (CE, Engl.: capillary electrophoresis) steht uns heute eine moderne und leistungsfähige Analysetechnik zur Verfügung [1, 2]. Diese verbindet die hohe Trennleistung und Selektivität der klassischen, elektrophoretischen Verfahren mit dem instrumentellen Fortschritt chromatographischer Techniken. Heutzutage ist die Kapillarelektrophorese eine etablierte Technik mit ausgereiften Konzepten für Entwicklung und Validierung von Methoden [3, 4]. Ihre Hauptarbeitsgebiete sind die Trennung von chiralen Analyten [5–7], gentechnologische hergestellten Produkten [8–10], klinischen Proben [11–13] und komplexen Mixturen [14, 15]. Für die Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurden DNA-Stränge mit Hilfe der Kapillarelektrophorese charakterisiert [16]. Durch den Einsatz verschiedener Modi kann die Kapillarelektrophorese vom anorganischen Salz bis zum Biopolymer trennen.

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Spannung wird auf eine mit Flüssigkeit gefüllte Kapillare von 20–150 µm Durchmesser angelegt und Strom fließt durch diese hindurch [17]. Da dieser Mechanismus sich wesentlich vom chromatographischen Trennprinzip – Trennung durch Differenzen im Adsorptionsverhalten – unterscheidet, waren die Hoffnungen während der Entwicklung der automatisierten Kapillarelektrophoresetechnik Anfang der 1990er Jahre groß. Sogar die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Engl.: High Performance Liquid Chromatography) sollte ersetzt werden [18]. Die fehlende Robustheit der Geräte und Methoden schreckte viele in dieser Zeit ab. Die Nachwirkungen aus dieser Zeit sind noch immer zu spüren, obwohl sich die Kapillarelektrophorese wesentlich weiterentwickelt hat [4]. Mittlerweile haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass die Kapillarelektrophorese die Robustheit, Reproduzierbarkeit und Möglichkeiten für Methodentransfer und –validierung besitzt [3, 19–24].

Für die Kapillarelektrophorese ist es aber immer noch schwierig sich gegen die seit langem etablierte und robuste HPLC durchzusetzen. In den Arzneibüchern Europas und der USA ist die HPLC eine Standardmethode für Gehalts- und Reinheitsprüfungen und somit in den Laboren der pharmazeutischen Industrie im Betrieb [25, 26]. Die HPLC hat sich auch im letzten Jahrzehnt noch weiterentwickelt; für immer mehr Anwendungen gibt es spezielle Säulen [27], die Analysenzeiten werden mit der schnellen HPLC, der UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography), verkürzt [28]. Aber es gibt noch immer Anwendungen,

wo das Auflösungsvermögen der HPLC nicht ausreichend ist. In diesen Fällen ist die Kapillarelektrophorese eine Alternative [2]. In der pharmazeutischen Industrie ist dies z.B. die Trennung von Enantiomeren. Immer häufiger wird die CE auch in der Reinheitsprüfung von Antikörpern eingesetzt [29]. Allerdings ist die Skepsis bei vielen Beteiligten geblieben. Die Neuanschaffung einer CE fordert qualifiziertes Personal und somit den Anwender. Regulierungsbehörden akzeptieren zwar Analytik mit Kapillarelektrophorese in Zulassungsunterlagen, jedoch werden von Seiten der pharmazeutischen Industrie vermehrte Nachfragen befürchtet [4].

Im Laufe der Jahre sind CE-Systeme immer ausgefeilter und robuster geworden. Ein wichtiger Parameter für die Reproduzierbarkeit von Trennungen und den resultierenden Elektropherogrammen ist die richtige und stabile Einstellung der Temperatur in der Kapillare. Während der Trennung entsteht Wärme aus der angelegten Spannung und dem durch die Kapillare fließenden Strom. Die Wärmemenge ist nicht unerheblich und nimmt Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substanzen, die die Wärme adsorbieren können. So beeinflusst sie die Strömungen in der Kapillare, beschleunigt den Abbau von Analyten und kann sogar zu Gasblasen führen. Die Messung der Temperatur im Inneren der Kapillare ist schwierig, meist werden aus bekannten, gut messbaren Werten, wie der Spannung, dem Stromfluss oder dem elektroosmotischen Fluss Temperaturen berechnet. Die Messung von Temperaturen an der Kapillaroberfläche und der Umgang der Wärme in verschiedenen kommerziell erhältlichen CE-Systemen wird ausführlich in Kapitel 3 diskutiert.

Die Kapillarelektrophorese hat mit der Monographie 2.2.47 auch Einzug ins Europäische Arzneibuch gehalten und wird für einige wenige Monographien zur Identitäts- und Reinheitsprüfung herangezogen [30]. In der letzten Überarbeitung des Europäischen Arzneibuches wurde die Monographie 2.2.47 Kapillarelektrophorese mit dem Japanischen Arzneibuch und dem US-amerikanischen Arzneibuch (USP, Engl.: The United States Pharmacopeia) harmonisiert. Allerdings fehlen immer noch Informationen über Variationsmöglichkeiten von Trennungskonditionen, wie sie bereits für chromatographische Trennungsmechanismen in der Monographie 2.2.46 beschrieben sind [18, 31]. Auch für die von Regulierungsbehörden vorgeschriebenen Qualifizierungen von analytischen Instrumenten ist noch kein ausgereiftes Konzept vorhanden gewesen. In Kapitel 4 wird ein durchgängiges Konzept für die zwei Qualifizierungsstufen vorgestellt, die nach dem USP General Chapter <1058> [32] in der Verantwortung des Nutzers liegen.

Die Kapillarelektrophorese ist neben dem Einsatz in der pharmazeutischen Industrie in vielen weiteren Bereichen und Forschungsgebieten präsent. Hier kann sie insbesondere ihre Stärke in der Analyse von komplexen Mischungen und ihre vielfältigen Möglichkeiten an verschiedenen Methoden einsetzen. In der Proteom-Forschung ist man an der Zusammensetzung von Proteinspezies einzelner Organismen oder Teilen davon interessiert. Gesucht werden potentielle Biomarker, die als Indikatoren für Krankheiten dienen können. Ursprünglich wird hier die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt, die aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) und Trennung nach Masse besteht. Auch in der Kapillarelektrophorese wird die isoelektrische Fokussierung eingesetzt und kann mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt werden. Diese Kombination reduziert den Arbeits- und Zeitaufwand und man erhofft sich eine wesentlich höhere Auflösung als in der 2D-Gelelektrophorese, die bis zu 10.000 Proteinspezies trennen kann [33]. In Kapitel 5 wird gezeigt, wie die in der Kapillarelektrophorese genutzte IEF für die Anwendung in der Proteom-Forschung optimiert werden kann und welche Faktoren berücksichtigt werden müssen.

In der pharmazeutischen Industrie werden üblicherweise die Reinheitsprüfungen von Proteinen und monoklonalen Antikörper mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Engl.: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) durchgeführt [34]. Für diesen Anwendungszweck wird nach und nach die Kapillargelelektrophorese (CGE, Engl.: capillary gel electrophoresis) eingesetzt [23, 29, 35]. In Kapitel 6 wird die Etablierung und die Optimierung dieser Technik erläutert. Mit einer Mischung aus Standardproteinen wurde getestet und bewertet, ob die CGE neben der Verwendung in Reinheitsprüfungen auch für die Bestimmung des Gehaltes geeignet ist.

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, die Anforderungen von pharmazeutischer Industrie, Forschung und Behörden an die Qualität der Analytik mit einer Kapillarelektrophorese zu erfüllen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kapillarelektrophorese (CE)

Das Prinzip in der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Teilchen unter dem Einfluss eines Gleichstromfeldes. Eine Trennung findet statt, wenn Probemoleküle sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegen, die von der Ladung, der Masse und dem Volumen der Teilchen abhängen. Unter diesen Bedingungen können geladene, kleine Moleküle, Nucleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Peptide, Proteine, Enzyme, Glycoproteine, Partikel und ganze Zellen getrennt und isoliert werden. Die Hauptarbeitsgebiete der Kapillarelektrophorese sind neben der Trennung von chiralen Substanzen [5–7], dementsprechend die Testung von biotechnologischen Produkten [8–10] und klinischen Proben [11–13], sowie die Trennung von komplexen Mixturen [14, 15].

Die verschiedenen Methoden werden in trägergestützte und trägerfreie Elektrophorese eingeteilt, wobei in trägergestützten Methoden Glasplatten mit Gel oder Folie zum Einsatz kommen. Wesentlich häufiger finden trägerfreie Methoden Anwendung, so dass diese nochmals z.B. nach ihrem Trennmechanismus oder dem Trennprinzip klassifiziert werden. Zur Kapillarelektrophorese gehören alle Techniken und Methoden, die in einem zylindrischen Trennkompartment – der Kapillare – durchgeführt werden [17].

In den letzten 30 Jahren seit der Einführung der Kapillarelektrophorese hat sie sich einige Vorteile gegenüber der klassischen Elektrophorese erarbeitet. Die Reproduzierbarkeit und Präzision insbesondere für die Quantifizierung wurden verbessert. Die Automatisierung fast aller Arbeitsschritte hat den manuellen Aufwand wesentlich reduziert, nur die Probe- und Pufferlösungen müssen noch vorbereitet werden. Der Einsatz von Probenwechsler und direkter Detektion, sowie die Anbindung an eine EDV-gestützte Steuerung und Auswertung haben den Probendurchsatz deutlich erhöht.

Zu den Methoden, die sowohl in der Elektrophorese als auch in der Kapillarelektrophorese zum Einsatz kommen, gehören die isoelektrische Fokussierung und die Gelelektrophorese, die hauptsächlich nach Molekülgröße trennt. Mit der Kapillarzonenelektrophorese, chiralen Trennungen, der Mizellaren, elektrokinetischen Chromatographie und der Kapillarelektrochromatographie stehen noch weitere Methode in der Kapillarelektrophorese zur Verfügung. In den Kapiteln 2.3 bis 2.5 werden die Methoden erläutert, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

2.1.1 CE-Systeme

Eine Kapillarelektrophorese besteht aus der Kapillare (Kapitel 2.1.2), einem Proben- und Pufferteller, dem Hochspannungsnetzteil, zwei Platinelektroden und dem Detektor (Kapitel 2.1.3). Abbildung 2-1 zeigt, wie die einzelnen Bestandteile zusammengehören. Zusätzlich ist gewöhnlich ein Drucksystem zum Injizieren von Proben (Kapitel 2.1.4) und Spülen der Kapillare, sowie ein Kühlungssystem eingebaut.

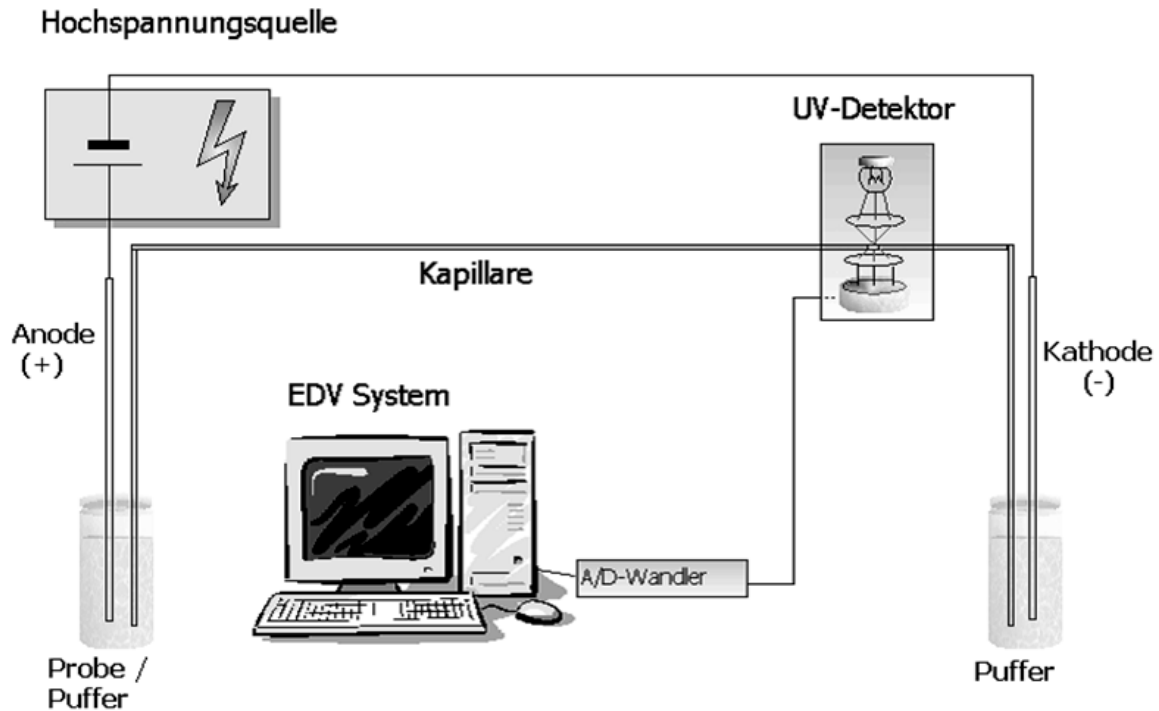


Abbildung 2-1: Schema einer Kapillarelektrophorese nach [36]

Die Hochspannungsquelle kann typischerweise 30 kV auf das System bringen und eine Stromstärke bis zu 200 μA ertragen. Es ist üblich, dass das Inletvial (Engl.: Einlassgefäß) an der Anode (Pluspol) ist. Proben können hier injiziert werden. Die Kapillare verbindet das Inletvial mit dem Outletvial (Engl.: Auslassgefäß). In diesem hängt die zweite Platinelektrode als Kathode (Minuspol). Wenn sowohl Inlet als auch Outlet mit einem Vial besetzt sind, welches mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, so entsteht ein geschlossenes System und Strom kann fließen. Bei der vorgestellten Polung haben sowohl die Spannung als auch die Stromstärke ein positives Vorzeichen. Für einige spezielle Anwendungen muss die Polung umgekehrt werden, so dass die Kathode am Inlet und die Anode am Outlet ist. Angelegte Spannung und die entstehende Stromstärke führen zu einer Leistung, die als Wärmeenergie frei wird. Deswegen ist der Einbau von Kühlungssystem obligatorisch in den aktuellen CE-Instrumenten. Es werden Ventilator, gerichtete, auf eine Temperatur eingestellte Luftströme oder Flüssigkühlung eingesetzt.

Die Detektion findet direkt in der Kapillare statt. Eingesetzt werden hauptsächlich Detektoren, die im ultravioletten und im sichtbaren Bereich des Lichts Absorption messen können. Weitere Möglichkeiten sind Fluoreszenzdetektoren, Massenspektrometer und eine elektrochemische Detektion (siehe Kapitel 2.1.3).

2.1.2 Kapillaren

Das Herzstück der Kapillarelektrophorese ist die Kapillare. Typischerweise besteht sie aus Quarzglas (fused-silica), das im Gegensatz zu den gebräuchlichen Gläsern aus reinem Siliciumdioxid aufgebaut ist. Daneben werden auch Kapillaren aus Glas hergestellt, die noch Beimengungen von Natrium und Calcium enthalten. Mittlerweile werden auch einige Polymere zur Herstellung genutzt. Seit die Kapillaren qualitativ hochwertig hergestellt werden, können reproduzierbare Trennbedingungen erzeugt werden. Da in der CE hauptsächlich und in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Kapillaren aus Quarzglas eingesetzt wurden, wird im Weiteren nur deren Einsatz beschrieben.

Die innere Oberfläche der Kapillare ist mit hydroxylierten Silanolgruppen bedeckt, die nach Deprotonierung negativ geladen sind (Abbildung 2-2). An diese negativ geladene Oberfläche lagern sich Kationen z.B. aus Puffer oder Spüllösungen fest an. Diese Schicht wird als Stern-Schicht genannt und ist Teil der statischen Doppelschicht. In der Debey-Hückel-Schicht befinden sich sowohl Kationen als auch Anionen in ihrer solvatisierten Form, so dass die Schicht sich noch bewegen kann. Sie wird auch als mobile Schicht bezeichnet. Diese Schichtung ist eine wichtige Voraussetzung für die treibende Kraft in der Kapillarelektrophorese, den elektroosmotischen Fluss (siehe Kapitel 2.2.2).

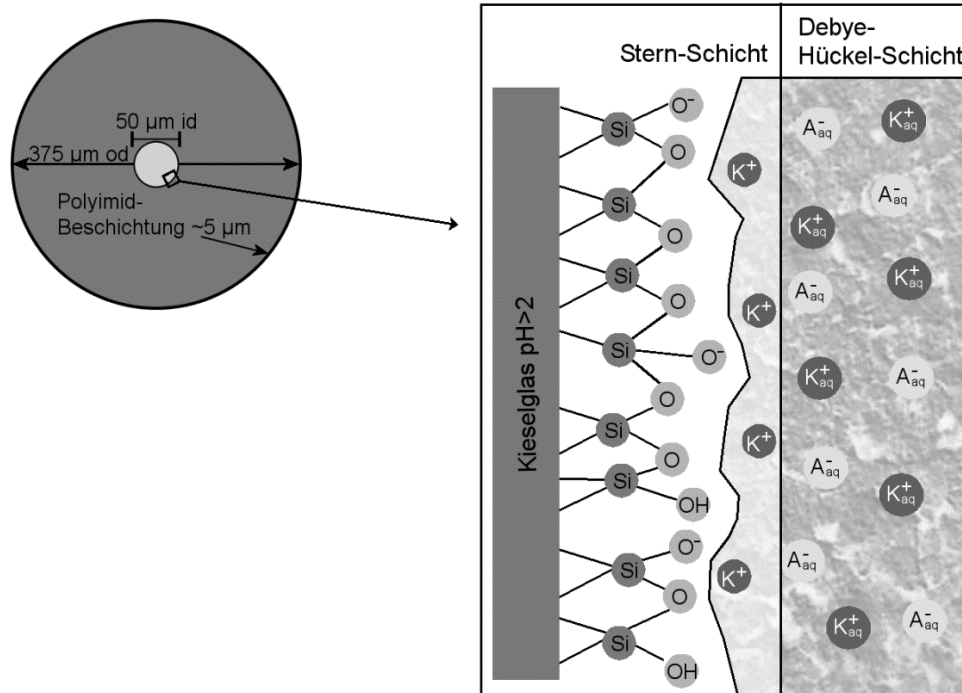


Abbildung 2-2: Aufbau von Kapillaren und deren innerer Oberfläche

Kapillaren mit Längen von 20 bis 100 cm, Innendurchmessern (id, Engl.: inner diameter) von 20 bis 100 µm und einem üblichen Außendurchmesser (od, Engl.: outer diameter) von 375 µm finden für die verschiedensten Methoden und Techniken ihre Anwendung. Je kleiner der Innendurchmesser einer Kapillare ist, desto größer ist die Oberfläche im Verhältnis zum Volumen. Die Abgabe überschüssiger Energie in Form von Wärme verbessert sich dadurch. Allerdings verringert sich mit dem Innendurchmesser auch gleichzeitig die optische Detektionslänge und somit die Sensitivität, da die Kapillare gleichzeitig auch als Detektionszelle fungiert. In der Methodenentwicklung muss ein Gleichgewicht zwischen Wärmeabgabe und Sensitivität gefunden werden, um den optimalen Kapillardurchmesser festzulegen.

Die Flexibilität von Quarzglas kapillaren wird durch eine Außenbeschichtung aus Polyimid erreicht. Die Handhabung wurde so wesentlich erleichtert. Damit die UV-Durchlässigkeit gewährleistet ist, muss ein Detektorfenster in die Außenbeschichtung gebrannt werden. Die Polyimidbeschichtung lässt sich mit einem Feuerzeug oder einem kleinen Gasbrenner verkohlen, die Reste können mit Aceton entfernt werden. Diese Prozedur wird gewöhnlich auch mit den Enden der Kapillare durchgeführt, da sich in die Außenbeschichtung Substanzen aus den Puffer- und Probelösungen einlagern können [37].

Da der Hydroxylierungsgrad der Silanolgruppen an der Glasoberfläche von Hersteller zu Hersteller stark variieren kann, werden die Kapillaren vor der ersten Nutzung mit einer

Natriumhydroxid-Lösung konditioniert. Die Konditionierung mit einer stark alkalischen Lösung, die durch die Kapillare teilweise bei erhöhter Temperatur von 40°C gepumpt wird, führt zu einer vollständigen Deprotonierung der Silanolgruppen. Eine erhöhte Temperatur hilft, dass sich das Gleichgewicht aus protonierten und deprotonierten Silanolgruppen schneller einstellt. Für diesen Schritt wird eine Mindestdauer von 30 min empfohlen. An die Konditionierung schließt sich üblicherweise ein Spülschritt mit dem Hintergrundelektrolyten (BGE, Engl.: background electrolyt) der anschließenden Analyse und einer Equilibrierung der Kapillare durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei Vials an, die mit BGE gefüllt sind. Der Spülschritt wird in einigen Standardarbeitsanweisungen mit einem zusätzlichen Schritt kombiniert. Dabei wird zusätzlich mit Wasser gespült, um die Kapillare möglichst komplett von der NaOH-Lösung zu säubern. Es hat sich auch bewährt, zusätzlich noch mit einer salzsauren Lösung zu spülen [38], besonders um die Wechselwirkungen von Proteinen mit der Kapillarwand zu unterbinden. Kapillaren sollten täglich vor Gebrauch einer ähnlichen Prozedur unterzogen werden, um einen reproduzierbaren elektroosmotischen Fluss zu gewährleisten (siehe auch Kapitel 2.2.2).

2.1.2.1 Beschichtungen

Die Deprotonierung von Silanolgruppen an der inneren Oberfläche der Kapillare führt zu einer negativ geladenen Fläche. Kationen sowohl aus der Pufferlösung als auch aus der Probe gehen Wechselwirkungen mit der Wand ein. Mit den Kationen aus der Pufferlösung bildet sich eine statische Doppelschicht aus, an der sich wiederum weitere Ionen der Pufferlösung anlagern, so dass eine zweite, mobile Schicht entsteht. Diese Schichtung ist erwünscht und führt zum sogenannten elektroosmotischen Fluss (Kapitel 2.2.2) eine Wechselwirkung von kationischen Analyten hingegen ist nicht erwünscht. Wenn eine Modulation des elektroosmotischen Flusses oder die Reduzierung der Wechselwirkungen von kationischen Analyten mit der negativ geladenen Kapillarwand gefordert wird, so können Beschichtungen der inneren Kapillarwand helfen. Unterteilt werden diese in dynamische und permanente Beschichtungen.

Substanzen, die als dynamische Beschichtung fungieren, bedecken die innere Oberfläche der Kapillare und somit die Oberflächenladungen. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Puffer und Kapillaroberfläche ein, welches von der Energie der Interaktion und der Konzentration des Zusatzes abhängig ist. Zu den dynamischen Beschichtungen gehören Tenside, zwitterionische Salze und hydrophile, lineare Polymere, die als Zusätze in den Elektrolytlösungen eingesetzt werden. Amine und Oligoamine können als kationische Substanzen durch elektrische Anziehungskräfte sehr fest an die Kapillarinnenwand binden, deswegen werden sie besonders häufig eingesetzt. Eine zweite Möglichkeit, die

Wechselwirkungen zu unterdrücken, ist der Einsatz von Substanzen, die die Viskosität in der Kapillare erhöhen. Hierzu gehören neutrale Cellulosederivate wie Hydroxyethylcellulose (HEC), Hydroxypropylcellulose (HPC) und Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). Eine Viskositätserhöhung führt jedoch zu einer Verlängerung der einzelnen Schritte einer Trennung, zusätzliche Spülschritte können sogar noch hinzukommen. Neben der Viskositätserhöhung können Cellulosederivate über die zahlreichen Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken mit den negativ geladenen Silanolgruppen bilden. Diese schützen die innere Kapillaroberfläche vor kationischen Analyten. Weitere Polymere, die zum Einsatz kommen, sind lineares Polyacrylamid (LPA), Tween 20, Brij 35 und Polyethylenglycol (PEG) [39, 40]. Substanzen, die für die dynamische Beschichtung genutzt werden können, sind günstig und einfach zu handhaben. Allerdings nehmen bereits kleine Veränderungen der Pufferzusammensetzung Einfluss auf die Beschichtungskonditionen, so dass Trennungen die nur mit dynamischen Beschichtungen durchgeführt werden, nur schlecht reproduzierbar sind. Gute Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit wurden mit Kombinationen aus dynamischer, hydrophiler und permanenter, hydrophober Beschichtung erzielt [41].

Für permanente Beschichtungen werden Polymere an die Silanolgruppen kovalent gebunden. Die Beschichtung ist nur dann effektiv, wenn an allen aktiven Silanolgruppen eine Derivatisierung stattfindet. Kapillaren mit einer permanenten Beschichtung benötigen keine weitere Konditionierung, sie sollten die Adsorption vollständig unterdrücken und einen konstanten elektroosmotischen Fluss über einen großen pH-Bereich erlauben. Außerdem sollten die Kapillaren und deren Beschichtungen reproduzierbar hergestellt werden und stabil für einen langen Zeitraum und einen großen pH-Bereich sein. Die beste Trennleistung zeigen Kapillaren mit einer Beschichtung aus linearem Polyacrylamid, die in den 1980er Jahren von Hjertén entwickelt wurde [42]. Weitere Substanzen für permanente Beschichtungen sind unter anderen Dimethylacrylamid und Epoxypoly(dimethylacrylamid). Neben Polyacrylamiden werden auch Kohlenhydrate, Polyethylenglykole und aliphatische Kohlenwasserstoffe kovalent mit der Kapillaroberfläche verknüpft [43]. Durch die verschiedenen Möglichkeiten an permanenten Beschichtungen kann man gut die Oberflächeneigenschaften der Kapillaren kontrollieren. Aber selbst mit Beschichtungen kann die z.B. die Proteinadsorption nicht vollständig unterdrückt werden [44].

2.1.3 Detektion

Die Detektion ist in der Kapillarelektrophorese einer der kritischen Aspekte der Analyse, da die Sensitivität der Detektion durch die winzigen Probenvolumina, durch die Anwesenheit des elektrischen Feldes und den kurzen optischen Wegstrecke limitiert wird [45].

Verschiedene Detektoren finden Verwendung, der Standard sind UV-VIS-Spektrometer. In den kommerziell erhältlichen Instrumenten werden üblicherweise diese verbaut, da die meisten Analyten im UV-VIS-Bereich absorbieren. UV-VIS-Detektoren sind ebenfalls der Standard in der HPLC, so gibt es eine große Auswahl von verschiedensten Herstellern und sie sind günstig zu erhalten. Die Vielseitigkeit und Geschwindigkeit der spektrometrischen Messung sind weitere Vorteile.

Daneben werden auch Laser-induzierte Fluoreszenzdetektoren (LIF-Detektor), elektrochemische Detektoren und Massenspektrometer eingesetzt. In der Entwicklung von neuen Instrumenten wird der Fokus auf LIF-Detektoren gesetzt, da diese eine außergewöhnliche gute Nachweisgrenze und einen großen, dynamischen Bereich vorweisen können [45]. Allerdings sind diese Detektoren nicht so flexibel einsetzbar wie UV-VIS-Detektoren, da nur wenige Analyten eine Fluoreszenz zeigen und aufwendige Derivatisierungen durchgeführt werden müssen [46].

Die elektrochemische Detektion kann in verschiedenen Modi durchgeführt werden und ermöglicht eine Empfindlichkeit im Bereich der LIF. Eingesetzt wird diese Technik vor allem in der Mikrochip-CE, da der Detektor und die dazugehörigen Kontrollinstrumente leicht miniaturisiert werden können.

Der Vorteil der Kopplung der CE mit einem Massenspektrometer ist die Kombination aus Trenneffizienz und Informationen über die Analyten. Zwei Probleme bei der Kopplung müssen dabei gelöst werden. Zum einen muss der Stromkreis der CE-Trennung geschlossen werden, zum anderen muss der Analyt in das Massenspektrometer transferiert werden. In den letzten 25 Jahren sind verschiedenste Ionisierungsmethoden und Anschlüsse entwickelt worden, mittlerweile gibt es auch erste kommerziell erhältliche Lösungen [47, 48].

2.1.3.1 Empfindlichkeit und Signal-Rausch-Verhältnis

Die Anforderungen an Detektoren sind beim Einsatz in der Kapillarelektrophorese wesentlich höher als in der HPLC, da die Kapillare auch als Küvette für die meisten Detektoren fungiert. Bei UV-VIS-Detektoren kommt dann das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 1) zum Einsatz, welches deutlich eine Abhängigkeit des Kapillarinneendurchmessers als Schichtdicke auf die Absorption und somit auf die Empfindlichkeit besitzt.

$$A(\lambda) = \frac{I_0}{I_p} = \varepsilon_i * c * d$$

$A(\lambda)$ Absorption bei der Wellenlänge λ

I_0 Lichtintensität des Referenzstrahles

I_p Lichtintensität des Probenstrahles

ε_i molarer Absorptionskoeffizient [$\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$]

c molare Konzentration des Analyten [$\text{mol} * \text{l}^{-1}$]

d Schichtdicke [cm]

Gleichung 1: Lambert-Beersches Gesetz

Im Vergleich mit UV-VIS-Detektoren in der HPLC oder als Spektrometer mit Schichtdicken von 1 cm sind die Kapillaren als Küvetten mit einer Schichtdicken von gewöhnlich 50 μm wesentlich dünner. Gleichzeitig wird in der CE auch weniger injiziert als in der HPLC (1-50 nl gegenüber 1-50 μl) [49].

Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, kann an verschiedenen Stellschrauben gedreht werden. In der CE werden üblicherweise wässrige Lösungen genutzt, deswegen können auch kürzere Wellenlängen als in der HPLC eingesetzt werden. Für die optimale Auswahl der Wellenlänge sind besonders die Spektren der Analyten zu beachten. Eine optimierte Einstellung der Wellenlängenbandbreite und der Ansprechzeit führt ebenfalls zu einer verbesserten Empfindlichkeit [49].

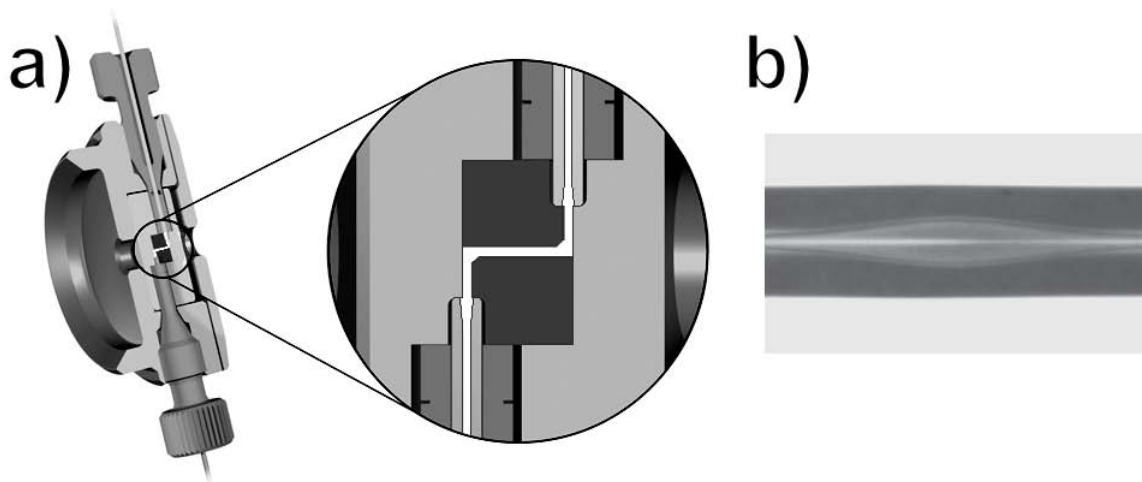


Abbildung 2-3: Schema einer Z-Zelle (a) und Foto einer Kapillare mit erweitertem Lichtweg, eine sogenannte Bubble-Cell (b) [50, 51].

Zur weiteren Steigerung der Sensitivität können spezielle Detektorzellen eingesetzt werden, wie z.B. die Z-Zelle oder Kapillaren mit verlängertem Lichtweg (Abbildung 2-3). Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von sogenannten Stacking-Techniken, die Konzentrierung von

Analyten in der Kapillare, zur Verbesserung der Empfindlichkeit und auch der Selektivität einer CE-Methode [52].

Im Zusammenhang mit der Empfindlichkeit ist auch das Signal-Rausch-Verhältnis (Gleichung 2) wichtig zu beurteilen und zu optimieren. Besonders für quantitative Analysen und der Integration von Elektropherogrammen ist ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis von Vorteil. Die nötigen Anforderungen für quantitative Analysen werden ausführlich in Kapitel 6.5 diskutiert.

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

S/N *Signal-Rausch-Verhältnis*

H *Signalhöhe*

h *Höhe des Basislinienrauschens*

Gleichung 2: Signal-Rausch-Verhältnis

In Gleichung 2 gehen zweimal die Höhe des Signals und die absolute Höhe der größten Rauschschwankung über die 20-malige Breite des Peaks in halber Höhe ein [30]. Auch das Signal-Rausch-Verhältnis ist abhängig von der Empfindlichkeit und der genutzten Wellenlängen. Für Proteine gilt zum Beispiel, dass sie zwei Wellenlängenmaxima im Bereich von 200 bis 220 nm und bei 280 nm besitzen, mit einem höheren Absorptionskoeffizienten im Wellenlängenbereich 200-220 nm. Das Rauschen der Basislinie ist ebenfalls von der Wellenlänge abhängig, im Bereich von 220-280 nm ist es am niedrigsten [53]. Weitere Faktoren, die Einfluss auf das Rauschen nehmen, sind die Absorption der Lösungen und der Innendurchmesser der Kapillare [53].

Die Datenerfassungsfrequenz zeigt an, wie viele Datenpunkte pro Sekunde aufgenommen werden. Um einen Peak zu erkennen und zu integrieren, sind mindestens 20 Datenpunkte notwendig [54]. Bei sehr schmalen Peaks muss die Absorption in sehr kurzen Abständen erfasst werden. Gleichzeitig verstärkt sich dadurch das Rauschen der Basislinie. Andersherum kann die Frequenz bei breiteren Peaks niedriger gewählt werden, so dass das Rauschen sich verringert.

2.1.4 Injektion

In der Kapillarelektrophorese gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Probelösung in die Kapillare zu injizieren. Zwei Modi, die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion, sind die Injektionsarten, die am häufigsten eingesetzt werden. Da in der CE das Injektionsvolumen nicht so eindeutig definiert werden kann wie mit der Schleifentechnik in

der HPLC, wird an der Injektionstechnik in der CE auch heute noch weiter entwickelt. Die Injektion ist ein wichtiger Bestandteil für präzise, quantitative Analysen. Besonders die präzise Injektion von Volumina im Nanoliter-Bereich ist eine Herausforderung. Die Präzision der Injektion lässt sich verbessern, wenn die Injektionsmenge erhöht wird. Das führt ebenfalls zu einem verbesserten Signal-Rauschverhältnis und einer Minimierung des Integrationsfehlers. Allerdings kann unter einer zu hohen Injektionsmenge die Effizienz der Trennung leiden. Die Optimierung der Injektion, insbesondere für quantitative Analysen, ist ein wichtiger Bestandteil der Methodenentwicklung.

2.1.4.1 Hydrodynamische Injektion

Voraussetzung für die hydrodynamische Injektion ist die Anwesenheit eines Druck- oder Vakuumsystems. Zur Injektion wird das Probengefäß üblicherweise am Inlet platziert, ein Überdruck wird im Vial aufgebaut und die Probe wird in die Kapillare hineingedrückt. Das Probenvolumen kann anhand des Gesetzes von Hagen-Poiseuille (Gleichung 3) berechnet werden. In die Gleichung fließen neben den Maßen der Kapillare (r und L), der angelegte Druck (Δp) und die dynamische Viskosität der Probenflüssigkeit (η) ein.

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi * r^4 * \Delta p}{8\eta * L}$$

\dot{V}	Volumenflussrate [m^3*s^{-1}]
V	Volumen [m^3]
t	Zeit [s]
r	Innenradius der Kapillare [m]
Δp	Druckdifferenz [Pa]
η	dynamische Viskosität der Probe [$Pa*s$]
L	Gesamtlänge der Kapillare [m]

Gleichung 3: Gesetz von Hagen-Poiseuille

Im idealen Fall sind sowohl die Probe als auch die Flüssigkeit in der Kapillare – normalerweise wird vor der Injektion mit dem Puffer für die Trennung gespült – wässrig, so dass für beide Flüssigkeiten die dynamische Viskosität von Wasser genutzt werden kann. Zu beachten ist, dass die Viskosität temperaturabhängig ist und immer zusammen mit einer Temperatur angegeben wird. So besitzt Wasser bei 20°C eine Viskosität von 1,008 mPa*s [55].

Wie eingangs zur Injektion bereits angemerkt, ist die Präzision der Injektion ein wichtiger Bestandteil zur quantitativen Analyse. Bei der hydrodynamischen Injektion ist das genutzte

Drucksystem für die Reproduzierbarkeit der Injektion bedeutsam. Folgende Voraussetzungen müssen mindestens erfüllt sein und sich reproduzieren lassen:

- es muss dicht sein
- innerhalb kurzer Zeit den eingestellten Druck von zumeist 50 mbar aufbauen
- die eingestellte Zeit genau einhalten, bevor der Druck wieder zügig abgebaut wird

Der gleichmäßige Druckaufbau und -abbau ist wichtig, um Strömungsturbulenzen zu verhindern, die wiederum die Reproduzierbarkeit verschlechtern. Einfluss auf die Strömungsturbulenzen nimmt auch die Viskosität der Probelösung. Im Idealfall strömt die Lösung laminar in die Kapillare.

2.1.4.2 Elektrokinetische Injektion

Die elektrokinetische Injektion bringt die Analyten in Abhängigkeit ihrer elektrophoretischen Mobilität in die Kapillare. Das Probengefäß wird hierfür am Inlet platziert, am Outlet ist üblicherweise ein Vial mit dem Puffer für die Trennung. Zwischen den Vials wird über eine definierte Zeit Spannung angelegt. Die positiv geladenen Analyten werden durch die Anode im Outletvial angezogen und wandern in die Kapillare. Neutrale und negativ geladene Teilchen bleiben im Probengefäß zurück. Mit anderen Einstellungen können statt der positiv geladenen Teilchen negativ geladene Teilchen in die Kapillare gebracht werden

Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass die Analyten in der Kapillare konzentriert werden können. Selbst kleinste Mengen können so analysiert werden. Voraussetzung ist, dass die Analyten geladen sind. Allerdings gibt die injizierte Probenmenge nicht die Konzentrationen im Probengefäß wieder, da die Analyten abhängig von ihrer elektrophoretischen Mobilität in die Kapillare wandern. Je höher die Mobilität, umso schneller und in einer größeren Menge ist der Analyt in der Kapillare. Dadurch können sich besonders bei geringen Probenkonzentrationen durch mehrfache Injektion aus demselben Vial die Konzentrationsverhältnisse in der Probe ändern. Wenn man mit dem bekannten, systematischen Fehler der elektrokinetischen Injektion umgehen kann, ist die Methode sehr gut um Analyten in der Kapillare auf zu konzentrieren.

Aufgrund der beschriebenen Problematik ist die hydrodynamische Injektion einer elektrokinetischen Injektion in Hinblick auf den Einsatz für eine quantitative Analyse überlegen. In Kapitel 6.3 werden die zwei Injektionsarten anhand einer Trennung von Proteinen verglichen und bewertet. Allerdings gilt, dass für jedes Trennproblem man sich am Anfang genau überlegen muss, welche der beiden Techniken für das jeweilige Problem optimal ist.

2.1.4.3 Andere Injektionsarten

Die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion sind die zwei hauptsächlich genutzten Injektionsarten. Für besondere Probleme kann die Injektion auch mit Vakuum durchgeführt werden. Im Gegensatz zur hydrodynamischen Injektion wird ein Vakuum auf das Outletvial angewendet und dadurch wird die Probe aus dem Inletvial in die Kapillare gezogen. Bei älteren Geräten und Methoden wird teilweise die hydrostatische Injektion eingesetzt, da anders als bei der hydrodynamischen Injektion kein Drucksystem für die Injektion benötigt wird. Über einen bestimmten Zeitraum wird das Outletvial einige Zentimeter unter das Niveau des Inletvials abgesenkt. Über das Prinzip der kommunizierenden Röhren steigt die Probe in die Kapillare auf.

2.2 Trennprinzip

2.2.1 Elektrophoretische Mobilität

Die Trennung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld wird durch unterschiedliche Migrationsrichtungen und –geschwindigkeiten bestimmt. Die elektrophoretische Mobilität mit der Einheit $[m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}]$ ist die Grundlage für die Wanderung von Analyten im elektrischen Feld. Dabei wandern Kationen zur Kathode und Anionen zur Anode. Verschiedene Kräfte und Effekte wirken sich auf diese Wanderung aus.

$$F_B = z_i \cdot e_0 \cdot E$$

F_B Beschleunigungskraft $[N]$

z_i Ladungszahl des Teilchens i

e_0 elektrische Elementarladung $[1,602 \cdot 10^{19} \text{ A} \cdot s]$

E Feldstärke $[V \cdot m^{-1}]$

Gleichung 4: Berechnung der beschleunigenden Kraft F_B

Die Teilchen werden nach Gleichung 4 proportional zur Feldstärke und zu ihrer Ladung beschleunigt. Gleichzeitig wirken der Bewegung Reibungskräfte entgegen, die von der dynamischen Viskosität des Trennpuffers, dem Radius des Teilchens und der Geschwindigkeit abhängig sind (Gleichung 5). Gleichung 5 ist aus dem Gesetz von Stokes abgeleitet und gilt für Teilchen mit einer sphärischen Form. Es wird bei der Berechnung angenommen, dass die zu trennenden Teilchen ebenfalls näherungsweise eine Kugel darstellen.

$$F_R = 6\pi * r_i * \eta * v_i$$

F_R *Reibungskraft [N]*

r_i *Radius des Teilchens i [m]*

v_i *Migrationsgeschwindigkeit des Teilchens i [$m*s^{-1}$]*

Gleichung 5: Berechnung der Reibungskraft F_R

Nach einer initialen Beschleunigungsphase stellt sich ein Gleichgewicht der zwei Kräfte F_B und F_R ein. Dadurch bewegen sich die Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit (Gleichung 6). Allerdings gilt dies nur für unendlich verdünnte Lösungen und beschreibt mit der zusätzlichen Annahme, dass es sich um sphärische Teilchen handelt, nur ein vereinfachtes Modell.

$$v_i = \frac{z_i * e_0 * E}{6\pi * r_i * \eta}$$

Gleichung 6: Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit v_i

Diese wird neben Teilchen-spezifischen Parametern wie der Ladungszahl und dem Radius von Methoden- und Geräte-spezifischen Parametern bestimmt. Um experimentelle Daten besser vergleichen zu können, wird die Geschwindigkeit auf die Feldstärke normiert und die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens berechnet (Gleichung 7). Die elektrophoretische Mobilität ist unter isothermen Bedingungen eine geräteunabhängige Größe. Aber wie bereits für Gleichung 6 gilt auch für Gleichung 7, dass es sich um ein vereinfachtes Modell handelt, dass die Mobilität in unendlich verdünnten Lösungen für sphärische Teilchen beschreibt.

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i * e_0}{6\pi * r_i * \eta}$$

μ_i *elektrophoretische Mobilität des Teilchens i [$m^2*s^{-1}*V^{-1}$]*

Gleichung 7: Berechnung der elektrophoretischen Mobilität μ_i

Die in der Kapillarelektrophorese eingesetzten Lösungen weichen von dem Modell der unendlich verdünnten Lösung ab und auch die Form und Größe der zu trennenden Teilchen kann nur mit großem Aufwand bestimmt werden. Der Durchmesser von solvatisierten Molekülen unterscheidet sich von den Werten, die man mithilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse berechnet. Zusätzlich werden die wandernden Ionen von Gegenionen angezogen und von diesen umgeben. Daraus ergibt sich ein größerer Teilchenradius R_{eff} und eine geringere effektive Ladung Q_{eff} der Teilchen. Mithilfe der Migrationsgeschwindigkeit und diesen Anpassungen kann man die effektive, elektrophoretische Mobilität berechnen (Gleichung 8).

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{v_d}{E} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6\pi * R_{\text{eff}} * \eta}$$

μ_{eff} effektive, elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]

v_d experimentelle Migrationsgeschwindigkeit des Teilchens i [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Q_{eff} effektive Ladungszahl des Teilchens i [$\text{A} \cdot \text{s}$]

R_{eff} Radius des Teilchens i in wässriger Lösung [m]

Gleichung 8: Berechnung der effektiven, elektrophoretischen Mobilität μ_{eff}

2.2.2 Elektroosmotischer Fluss

Zur effektiven, elektrophoretischen Mobilität leistet der elektroosmotische Fluss (EOF) einen zusätzlichen Beitrag zur Wanderungsgeschwindigkeit von Teilchen. Die elektrostatische Doppelschicht, die sich in Kapillaren mit einer amorphen, polymeren Siliciumdioxid-Oberfläche ausbildet, ist hauptursächlich für die Elektroosmose, also dem Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld. Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben lagern sich an die negativ geladene Oberfläche der deprotonierten Silanolgruppen Kationen der Pufferlösung an. Abbildung 2-4 zeigt die zwei Schichten, die sich ausbilden. Zum einen lagern sich Kationen in einer starren Schicht an, die als Stern- oder innere Helmholtz-Schicht benannt wird. In dieser verlieren nach dem Model von Stern die Kationen ihre Solvathülle und sind vollständig unbeweglich. In der diffusen, mobilen Schicht, die als Debye-Hückel- oder äußere Helmholtz-Schicht bezeichnet wird, liegt ein Überschuss an Kationen vor, die im Gegensatz zu den Kationen in der Stern-Schicht noch solvatisiert und beweglich sind. Von der Debye-Hückel-Schicht ist der Übergang zur wässrigen, elektrische neutral erscheinenden Phase fließend. Unter Mitnahme der Wassermoleküle bewegen sich die Kationen der Debye-Hückel-Schicht in Richtung Kathode, sobald eine positive Spannung angelegt wird. Die gesamte Flüssigkeitssäule in der Kapillare kommt so in Bewegung und die resultierende Strömung wird als elektroosmotischer Fluss bezeichnet.

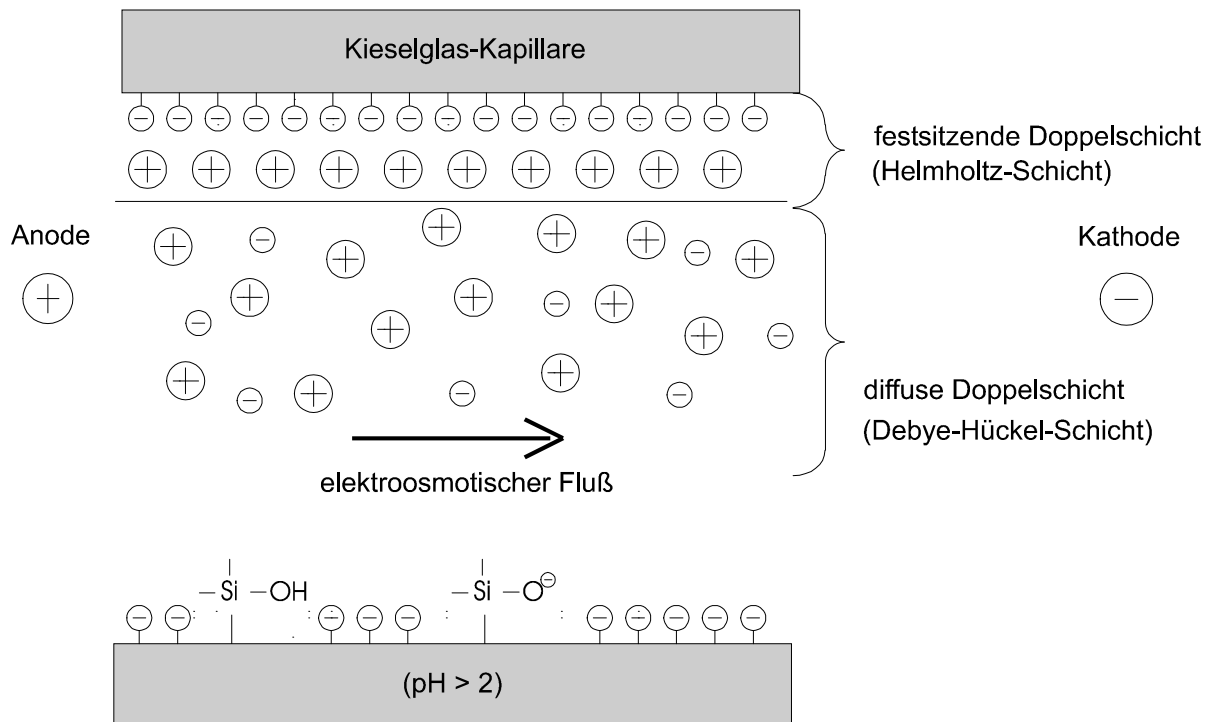


Abbildung 2-4: Entstehung des elektroosmotischen Flusses [7]

Die Stärke des elektroosmotischen Flusses ist abhängig von der angelegten Spannung, der Ionenstärke und dem pH-Wert der Pufferlösung bzw. der Vorbehandlung der Kapillarwand. Je mehr Silanol-Gruppen deprotoniert sind, desto stärker bildet sich der elektroosmotische Fluss aus. Mit der Hilfe des EOFs können dann auch neutrale und sogar anionische Teilchen an der Kathode detektiert werden. Abbildung 2-5 zeigt die Auswirkung des EOFs auf die Migrationsgeschwindigkeit von verschiedenen Teilchen. Die roten Pfeile stellen die effektive elektrophoretische Mobilität dar, die grauen zeigen die Mobilität des elektroosmotischen Flusses an. Wenn beide Mobilitäten zusammengerechnet werden, so erhält man die im Experiment messbare Mobilität μ_{app} (Gleichung 10). Neutralteilchen wandern mit dem EOF, allerdings werden diese praktisch nicht getrennt. Kationen wandern mit einer größeren, Anionen mit einer kleineren Geschwindigkeit als der EOF. Zwar trägt der EOF nicht zur Trennung der Analyten bei, aber er wirkt sich durch seinen Einfluss auf die Gesamtmobilität auf die Analysenzeit und somit auf die Trennleistung eines Systems aus. Durch die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen kann der EOF in seiner Wirkung abgeschwächt oder sogar umgekehrt werden. Die Beschichtung, dynamisch oder permanent (siehe Kapitel 2.1.2.1), der Kapillarwand kann ebenfalls den EOF modulieren.

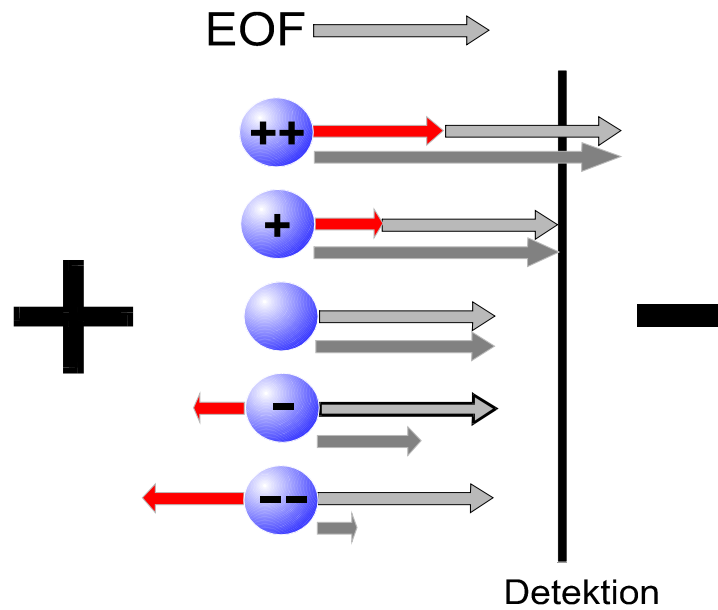


Abbildung 2-5: Auswirkung des elektroosmotischen Flusses auf verschiedene Teilchen [56]

Die Geschwindigkeit, mit der der EOF strömt, kann mithilfe von sogenannten EOF-Markern bestimmt werden. Als EOF-Marker werden Substanzen eingesetzt, die über einen großen pH-Bereich hinweg neutral und gut löslich sind. Natürlich müssen sie in der angewendeten Methode detektierbar sein. Die Mobilität des EOFs kann dann mit der Migrationszeit des EOF-Markers berechnet werden (Gleichung 9).

$$\mu_{EOF} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{L_{eff} * L_{tot}}{t_i * U}$$

μ_{EOF} elektroosmotische Mobilität [$m^2 * s^{-1} * V^{-1}$]

v_{EOF} Migrationsgeschwindigkeit des EOF-Markers [$m * s^{-1}$]

L_{eff} effektive Kapillarlänge [m]

L_{tot} gesamte Kapillarlänge [m]

t_i Migrationszeit des Teilchens i [s]

U Spannung [V]

Gleichung 9: Berechnung der elektroosmotischen Mobilität μ_{EOF}

Die in Abbildung 2-5 gezeigten Auswirkungen des EOFs auf verschiedene Teilchen werden in den nachfolgenden Gleichungen genutzt, um die effektive, elektrophoretische Mobilität (siehe Gleichung 8) aus experimentellen Daten bestimmen zu können.

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

μ_{app} experimentelle Mobilität [$m^2 * s^{-1} * V^{-1}$]

Gleichung 10: Zusammensetzung der experimentellen Mobilität μ_{app}

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{v_i}{E} - \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{L_{\text{tot}} * L_{\text{eff}}}{U} * \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right)$$

Gleichung 11: Berechnung der effektiven elektrophoretischen Mobilität μ_{eff} aus experimentellen Daten

Im Gegensatz zur HPLC und ihrem parabolischem Strömungsprofil ist die Geschwindigkeit der Flüssigkeitssäule in der Kapillare fast über den gesamten Querschnitt hinweg einheitlich (Abbildung 2-6). Das stempelförmige Strömungsprofil führt dazu, dass die Zonenverbreiterung im Vergleich mit der HPLC geringer ausfällt und somit eine höhere Trennleistung erreicht wird. Axialdiffusion und Konvektion, die nicht vollständig trotz effizienter Wärmeableitung eliminiert werden kann, finden innerhalb der Probenzone weiterhin statt. Aus den verschiedenen Einflüssen entstehen somit die schlanken, gaußförmigen Peaks in der Kapillarelektrophorese. Ein definierter, stabiler EOF ist wichtig für die Reproduzierbarkeit einer Methode, aber auch für die Selektivität und die Auflösung.

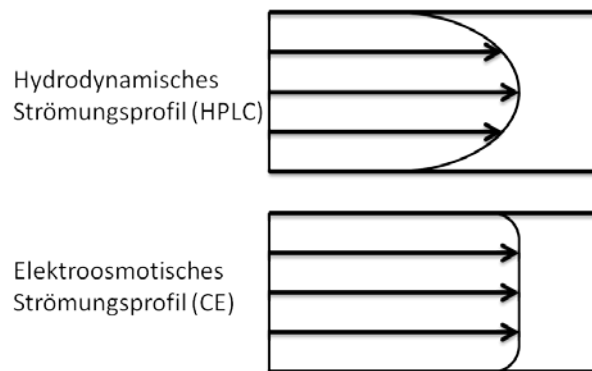


Abbildung 2-6: Vergleich der Strömungsprofile von HPLC und CE

2.2.3 Entstehung von Joulescher Wärme

Die Temperatur ist in der Kapillarelektrophorese ein kritischer Parameter. Wenn die Spannung U in einer mit Elektrolyt gefüllten Kapillare angelegt wird, fließt Strom I durch das System. Das Produkt (Gleichung 12) aus diesen beiden Größen ist die Leistung P . Gleichung 12 kann mit dem Ohmschen Gesetz kombiniert werden, dadurch entsteht Gleichung 13, die den Widerstand R mit einbezieht.

$$P = U * I$$

P Leistung [W]

I Stromstärke [A]

Gleichung 12: Berechnung der Leistung P

$$P = \frac{U^2}{R} = I^2 * R$$

R *Widerstand [Ω]*

Gleichung 13: Zusammenhang zwischen Leistung und Widerstand

Elektrische Leistung, die in einem Widerstand erzeugt wird, wird durch die ihr entgegengesetzte innere Reibungskraft zu Wärme umgewandelt [57], der sogenannten Jouleschen Wärme. Die entstehende Wärme wirkt sich auf verschiedene Parameter aus, die wiederum einen Einfluss auf eine kapillarelektrophoretische Trennung haben. Wenn die Temperatur innerhalb der Kapillare steigt, dann verändern sich die Werte der elektrischen Leitfähigkeit κ , der Viskosität η und des Zetapotentials ζ des Puffers.

$$\eta = 2,761 * 10^{-3} * e^{\frac{1713K}{T}}$$

T *absolute Temperatur [K]*

Gleichung 14: Andrade-Gleichung

Gleichung 14 wurde aus experimentellen Daten von Wasser berechnet und zeigt deutlich die Abhängigkeit der Viskosität η von der Temperatur T [58]. Als Vereinfachung wird diese Gleichung auch für Pufferlösungen angenommen.

Besonders die Viskosität aber auch weitere Parameter wie das Zetapotential haben einen Einfluss auf die Mobilität des elektroosmotischen Flusses μ_{EOF} und den Diffusionskoeffizienten D , wie Gleichung 15 und Gleichung 16 zeigen [58–60].

$$\mu_{EOF} = -\frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta}$$

ϵ_0 *Permittivität des Vakuums [$A*s*V^{-1}*m^{-1}$]*

ϵ_r *relative Permittivität*

ζ *Zetapotential [V]*

Gleichung 15: Abhängigkeiten der Mobilität des elektroosmotischen Flusses μ_{EOF}

$$D = \frac{k_B * T}{6\pi * \eta * r_h}$$

D *Diffusionskoeffizient [m^2*s]*

k_B *Boltzmann-Konstante [$J*K^{-1}$]*

r_h *hydrodynamischer Radius [m]*

Gleichung 16: Stokes-Einstein-Gleichung

Die beschriebenen Parameter und weitere sind über eine Vielzahl von Gleichungen vernetzt, von denen nur die wichtigsten vorgestellt werden. Einen ausführlicheren Überblick bieten die

Referenzen [59] und [60]. Insgesamt wirkt sich die Entstehung von Wärme vor allem auf die Effizienz der Trennung aus. Die berechnete Effizienz wird häufig nicht erreicht, da die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten und ein möglicher Temperaturanstieg während der Trennung nicht berücksichtigt werden. Gleichung 17 zeigt die Abhängigkeit der Effizienz bzw. der theoretischen Böden N von dem Diffusionskoeffizienten der zu untersuchenden Substanz.

$$N = \frac{\mu_{app} * E * L_{eff}}{2D} = \frac{\mu_{app} * U * L_{eff}}{2D * L_{tot}}$$

N *theoretische Trennstufe*

Gleichung 17: Berechnung der theoretischen Böden N

In der Kapillare ist allerdings die Temperatur nicht in allen Bereichen gleich. So bildet sich in Längsrichtung ein Temperaturgradient aus, da die Teilstücke in den Vials und im Detektor nicht gekühlt werden [60, 61]. Auch die Wärmeabgabe an die Kapillaraußenwand verursacht einen radialen Gradienten, der zu einer parabolischen Verteilung führt (siehe Abbildung 2-7 und Referenz [62]). Diese Temperaturunterschiede können zu Störungen im Geschwindigkeitsprofil des elektroosmotischen Flusses führen [61].

Das Resultat der Temperaturerhöhung wird in den Elektropherogrammen deutlich. Die Stabilität von Migrationszeiten [58, 63] und Peakflächen [59, 64] verschlechtert sich. Änderungen im Diffusionskoeffizienten führen zu einer Verbreiterung der Peaks [59, 61], die sich ebenfalls negativ auf die Präzision der Peakflächen auswirken kann. Weitere Probleme infolge der Temperaturerhöhung durch die Joulesche Wärme sind ein Probenverlust durch Volumenausdehnung [65], der thermische Abbau labiler Substanzen [64], sowie eine instabile Basislinie und die Wahrscheinlichkeit, dass die Lösung in der Kapillare kocht.

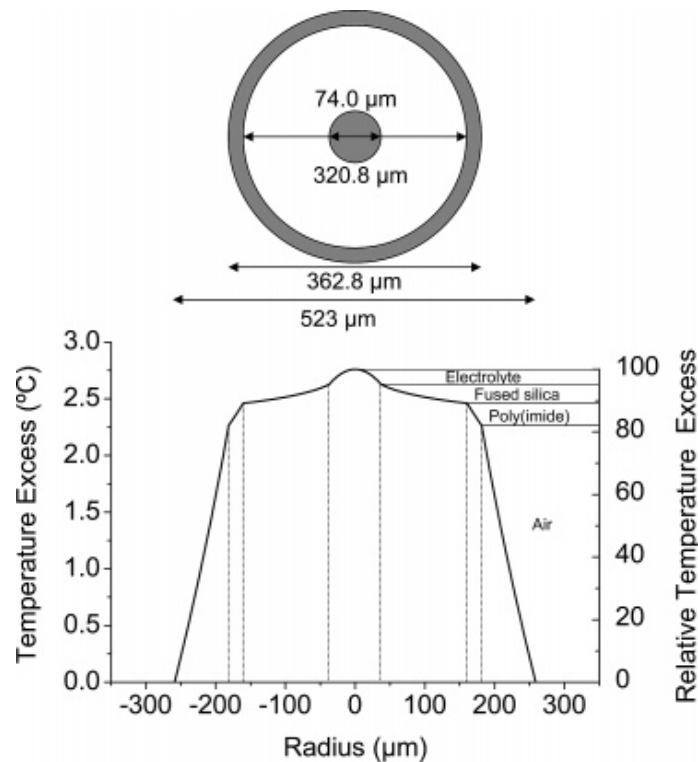


Abbildung 2-7: Temperaturprofil in einer unbeschichteten Glaskapillare (ID 74 μm, OD 362,8 μm) bei einer Leistung von 1 W/m nach [62]. (Relative) Temperature Excess bedeutet (relativer) Temperaturüberschuss gegenüber der eingestellten Temperatur.

Bereits während der Erarbeitung von Methoden sollte die Wärmeentwicklung beobachtet werden. Kommerziell erhältliche Geräte für die Kapillarelektrophorese zeigen nur die Temperatur für das Kühlungssystem an und steuern diese. Die Temperatur in der Kapillare kann allerdings nicht bestimmt werden.

Seit dem Aufkommen der Kapillarelektrophorese haben sich bereits verschiedene Autoren mit direkten und indirekten Methoden zur Temperaturbestimmung innerhalb der Kapillare beschäftigt. Rhodamine B wird häufig sowohl in der Kapillarelektrophorese, als auch in Elektrophorese-Chips eingesetzt, da dieser Farbstoff eine temperaturabhängige Fluoreszenz zeigt [66–68]. Indirekt kann die Temperatur auch aus verschiedenen Parametern, wie dem elektrischen Leitwert [69], der elektroosmotischen Geschwindigkeit oder dem Anstieg des Stromes [58] berechnet werden. Allerdings wird bei allen Temperaturen, die aus Parametern bestimmt werden, der Mittelwert der Temperatur über die gesamte Länge der Kapillare berechnet. Mittlerweile können über einen iterativen Algorithmus Temperaturen in gekühlten und nicht gekühlten Bereichen der Kapillare getrennt berechnet werden [70].

2.3 Kapillaronenelektrophorese (CZE)

2.3.1 Einleitung

Zur Zonenelektrophorese gehören sowohl trägerfreie als auch trägergestützte Methoden. In der Kapillarelektrophorese ist die Kapillaronenelektrophorese (CZE, Engl.: capillary zone electrophoresis) das einfachste und am häufigsten eingesetzte Verfahren. Jorgenson und Lukacs führten 1981 die Technik mit der erstmaligen Anwendung von 75 µm Kapillaren ein [71]. Mittlerweile hat das Verfahren auch Einzug in das europäische Arzneibuch gefunden. Die Prüfung auf Identität und Reinheit von Erythropoietin (EPO) wird mit einer CZE-Methode mit dynamischer Beschichtung durchgeführt [72]. Auch der Gehalt von Wirkstoffen kann mithilfe der CZE bestimmt werden. Beispiele sind in großer Anzahl im Review von Suntornsuk [73] und im Sammelwerk von Lunn [74] aufgeführt.

2.3.2 Trennung nach Mobilitäten

Die Trennung erfolgt in einem einheitlichen Grundelektrolyten, pH-Wert und die Feldstärke sind im gesamten Trennbereich konstant. Zumeist ist der Grundelektrolyt eine Pufferlösung, die fast den gesamten Stromtransport übernimmt. Die Trennung erfolgt über Unterschiede in der Mobilität, wie sie bereits im Kapitel 2.2 beschrieben sind. Der EOF ist abhängig vom eingesetzten Trennelektrolyten und nimmt dadurch ebenfalls Einfluss auf Trennung und Selektivität. Auf die Selektivität und die Trennleistung kann über die in Tabelle 2-1 beschriebenen Faktoren Einfluss genommen werden. Mit der CZE lassen sich sowohl Kationen als auch Anionen auftrennen; neutrale Teilchen werden als Einheit detektiert (vergleiche Kapitel 2.2).

Tabelle 2-1: Einflussfaktoren der CZE

Trennelektrolyt	pH-Wert, Ionenstärke, organische Zusätze
Kapillare	Länge, Durchmesser
Kapillarelektrophorese	Spannung, Feldstärke, Temperatur
Probe	Vorbereitung (Lösemittel, Ionenstärke), Injektionszeit

Die Feldstärke ist in der CZE eine konstante Größe über die gesamte Kapillarlänge, dadurch können die Gleichungen zur Berechnung der Geschwindigkeit der Analyten zur Anwendung kommen (Gleichung 6 - Gleichung 11).

2.3.3 Konzentrierung von Analyten in der Kapillare

Unter „sample stacking“ werden alle Methoden zusammengefasst, die zu einer Konzentrierung von verdünnten Proben führen und somit die Effizienz und Sensitivität der Trennung verbessern. In der Kapillarzonen-elektrophorese nutzt man die Konzentrierung durch unterschiedliche Ionenstärken oder pH-Werten von Probelösung und Trennelektrolyten. Für die Methode „large-volume sample stacking“ (LVSS) wird die Probe hydrodynamisch injiziert. Die Probelösung besitzt nur eine sehr geringe Ionenstärke, die Geschwindigkeit des Analyten innerhalb der Zone ist durch die große elektrische Feldstärke hoch. Wenn die Teilchen auf den Trennelektrolyten mit einer wesentlich höheren Ionenstärke und einer wesentlich geringeren elektrischen Feldstärke treffen, so sinkt die Geschwindigkeit des Analyten und die Teilchen konzentrieren sich auf (Abbildung 2-8).

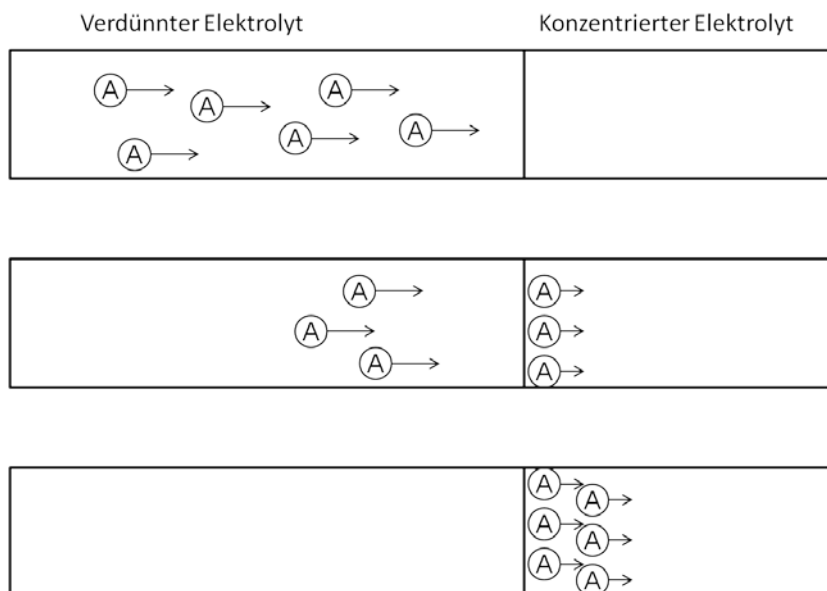


Abbildung 2-8: Konzentrierung durch unterschiedliche elektrischer Feldstärken in den unterschiedlich konzentrierten Elektrolyten nach [75]

Ebenfalls häufig eingesetzt werden die Methoden „field-amplified sample stacking“ (FASS) und „field-amplified sample injection“ (FASI). Letztere ist für Methoden, in denen die Probe elektrokinetisch injiziert wird. Ähnlich wie die in Abbildung 2-8 dargestellte Methode kann durch die Anwendung unterschiedlicher pH-Werte der Probelösung und des Trennelektrolyten die Teilchen des Analyten ausgebremst und in einer engen Zone im Trennelektrolyten konzentriert werden. Sowohl für die hydrodynamische als auch für die elektrokinetische Injektion sind verschiedenste Methoden beschrieben [52, 75, 76].

2.4 Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF)

2.4.1 Einleitung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) trennt Ampholyte, wie z.B. Proteine und Peptide, in einem pH-Gradienten anhand ihrer unterschiedlichen Ladungen. Hjertén und Zhu etablierten die bereits seit den 1970er in der Gelelektrophorese bekannte Technik 1985 auch in Glaskapillaren [77]. Seitdem wurde die isoelektrische Fokussierung in der Kapillare (CIEF, Engl.: capillary isoelectric focusing) in vielen Bereichen weiterentwickelt. Diese Technik ist sowohl in der Gel- als auch in der Kapillarelektrophorese etabliert. Der Trennmechanismus ist der gleiche, allerdings gibt es entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Methoden.

2.4.2 Trennung nach isoelektrischen Punkten

Bei einem bestimmten pH-Wert in der Umgebung ist die Summenladung eines Proteins null, da gleich viele negative und positive Ladungen über das Protein verteilt sind. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (IEP) bezeichnet. Das Protein ist nach außen elektrisch neutral und besitzt nur eine geringe Löslichkeit. Dieser Wert ist abhängig von der Zusammensetzung der Aminosäuren und damit eine eindeutig definierte physikochemische Eigenschaft für jedes Protein.

In der isoelektrischen Fokussierung wird ein pH-Gradient mit sogenannten Trägerampholyten (CA, Engl.: carrier ampholytes) in einem elektrischen Feld aufgebaut. Die CA sind eine Mischung aus vielen verschiedenen Polyaminocarbonsäuren. Deren IEPs verteilen sich von sauer bis basisch und liegen idealerweise nahe beieinander. Die Anode steht in einer sauren Lösung, z.B. Phosphor- oder Asparaginsäure, die Kathode in einer basischen Lösung von z.B. Natriumhydroxid oder Arginin. Die CA trennen sich im elektrischen Feld nach ihren IEPs auf, da z.B. positiv geladene Ampholyten zur Kathode wandern, bis der pH-Wert der umgebenden Lösung dem IEP entspricht. Wenn die Mischung viele Trägerampholyte enthält, so entsteht ein gleichmäßiger Gradient. Die meisten kommerziell erhältlichen Ampholytmischungen bauen allerdings keinen linearen Gradienten auf, da es Unterschiede in der Verteilung von Basen und Säuren gibt [78].

Die Probe, die z.B. Proteine enthält, verteilt sich gleichzeitig mit dem CA, während ein elektrisches Feld angelegt ist. Wenn die Proteine ihren IEP erreichen, sinkt die Summenladung und damit auch die Mobilität auf null. So konzentrieren sich die Analyten in einer scharfen Zone. Dieser Prozess wird als Fokussierung beschrieben und ist beendet,

wenn nur noch ein minimaler Strom fließt. Abbildung 2-9 stellt diesen Prozess schematisch dar.

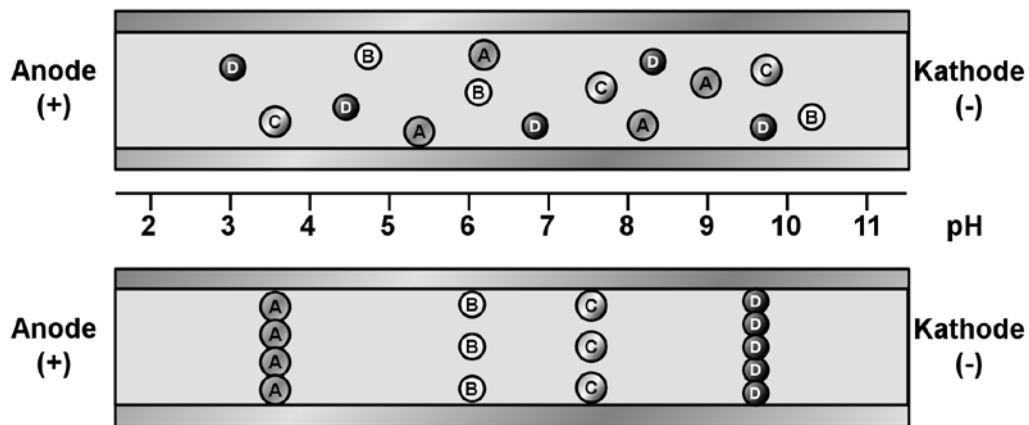


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung der Fokussierung nach [36]

In der klassischen, zweistufigen CIEF (Engl.: two-step CIEF) schließt sich nach der Fokussierung die Mobilisierung an [77]. Nach der Fokussierung sind die Analyten in der Kapillare verteilt. Für die Detektion müssen diese noch zum Detektionsfenster befördert werden. Dies geschieht entweder durch Anlegen eines Druckes (hydrodynamische Mobilisierung) oder durch Wechseln der Lösung an Anode oder Kathode (chemische Mobilisierung).

Während der hydrodynamischen Mobilisierung wird neben dem Druck auch weiterhin ein elektrisches Feld angelegt. So werden die fokussierten Zonen aufrechterhalten. Ohne zusätzliches elektrisches Feld verschlechtert sich die Auflösung durch Verbreiterung der Zonen. Optimal ist eine Kombination aus viskositätserhöhenden Substanzen, z.B. Cellulosen, und nur schwachem Druck [79]. Für die chemische Mobilisierung, auch elektrophoretische Mobilisierung genannt, wird die Zusammensetzung von Anolyten oder Katholyten geändert, z.B. durch Zusatz von Natriumchlorid. Dadurch verschiebt sich der pH-Gradient. Die fokussierten Banden erhalten wieder eine Ladung und bewegen sich zum Detektor [79].

Neben der zweistufigen CIEF kann die Mobilisierung bereits während der Fokussierung stattfinden (Engl.: single-step CIEF). Dafür muss ein moderater EOF vorhanden sein, der in der zweistufigen CIEF fast vollständig unterdrückt wird. Genutzt werden unbeschichtete Kapillaren, deren Oberflächeneigenschaften und damit auch deren EOF stark pH-Wert abhängig sind. Um trotzdem reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden verschiedene Zusätze, wie z.B. Polyethylenglykol (PEG) benötigt [79–81].

2.4.3 Isoelektrische Fokussierung in der Gel- und der Kapillarelektrophorese

Die CIEF besitzt eine Reihe von Vorteilen. Gegenüber der IEF in der Gelelektrophorese ist sie schneller und automatisierbar. Die Analyten können bereits in der Kapillare detektiert werden. Beide Methoden erreichen eine hohe Auflösung und benötigen nur kleine Probenmengen [82]. Die Reproduzierbarkeit der CIEF ist allerdings noch ein Problem (siehe auch Kapitel 5.1). In der IEF wird ein Puffersystem kovalent in eine Gelmatrix gebunden. Diese Gele besitzen eine hohe Stabilität, eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Auflösung.

2.4.4 Anwendungen

Die CIEF ist heute eine gängige Technik in der Analyse von Biopharmazeutika [83], Körperflüssigkeiten [84] und ganzen Zellen [85]. Proben aus der Proteom-Forschung lassen sich ebenfalls untersuchen, insbesondere die Kupplung mit der Massenspektrometrie ist hier von Interesse [14, 86]. Da die reproduzierbare Mobilisierung der Analyten noch ein Problem darstellt, wurde für die CIEF ein Detektor entwickelt, der die Kapillare zu großen Teilen überwacht (WCID, Engl.: whole column imaging detector). Die dazugehörige Technik wird imaged CIEF (iCIEF) genannt. Die Mobilisierung fällt weg, die Analysenzeit verkürzt sich und die Verbreiterung der Peaks während der Mobilisierung findet ebenfalls nicht mehr statt. In Referenz [83] werden die verschiedenen Möglichkeiten dieser Technik in der Analyse von Glycoproteinen vorgestellt.

2.5 Kapillargelelektrophorese (CGE)

2.5.1 Einleitung

Für Proteintrennungen nach der Größe bzw. dem Molekulargewicht wurde das Konzept der SDS-PAGE in die Kapillarelektrophorese übertragen. Mit wesentlich weniger Aufwand im Labor kann man auch in der Kapillarelektrophorese Proteine nach Größe trennen. Die ersten Artikel wurden in den achtziger Jahren veröffentlicht [87, 88], seitdem wurden verschiedene Substanzen als permanentes oder austauschbares Gel eingesetzt (siehe 2.5.3.).

Mittlerweile wird die Kapillargelelektrophorese in der Forschung und Routine vielfältig eingesetzt. Die Lebensmittelindustrie kontrolliert z.B. mit Wasser und Salz löslichen Proteinen die Fleischqualität von Rind und Strauß [89]. In der klinischen Forschung können z.B. aus Blutproben extrahierte Proteine untersucht werden [90]. Auch in der pharmazeutischen Industrie wird die Technik eingesetzt, um z.B. Antikörper zu untersuchen.

Dabei wird CGE in allen Stadien der Arzneimittelentwicklung genutzt, d.h. von der Entwicklung von Zellkulturen bis hin zur Qualitätskontrolle fertiger Arzneimittel [29].

2.5.2 Gegenüberstellung von Gelelektrophorese und Kapillarelektrophorese

Die Trennmechanismen in SDS-PAGE und CGE sind sich sehr ähnlich, allerdings entfallen viele der aufwendigen Arbeitsschritte der SDS-PAGE.

In der Gelelektrophorese werden Gele durch die Polymerisierung von Acrylamid hergestellt, die Porengröße kann über die Konzentration der Monomere eingestellt werden. Die SDS-PAGE wird seit mehreren Jahrzehnten in biologisch-wissenschaftlichen Laboren als Standardmethode angewendet. Auch im Arzneibuch wird sie für Identitäts- und Reinheitsprüfungen von z.B. monoklonalen Antikörpern empfohlen.

Wenn man die am weitesten verbreitete Technik, die diskontinuierliche Elektrophorese, durchführt, muss man folgende Schritte abarbeiten. Das Gel wird in zwei Schritten gegossen, zuerst das engporige Trenngel, danach das großporige Sammelgel. Dieses wird in ein Gerät zur Durchführung der Elektrophorese eingespannt. Die Proben müssen vor der Beladung des Geles mit Natriumdodecylsulfat (SDS, Engl.: sodium dodecyl sulfate) denaturiert werden. In diesem Schritt bildet sich ein Protein-SDS-Komplex, der ein Massenverhältnis von ca. 1:1,4 besitzt. Dadurch wird die ursprüngliche Ladung von den SDS-Molekülen überdeckt und es erfolgt eine Trennung nur nach den Molekülgrößen. Nach der Trennung müssen die Proteine im Gel fixiert werden. In einem weiteren Schritt kann das Gel eingefärbt werden, z.B. mittels einer kolloiden Coomassie-Lösung [91]. Danach muss es wieder entfärbt werden. Mit Detektoren, ähnlich wie einem Scanner, können die Gele digitalisiert und ausgewertet werden. Mit einer Standardarbeitsanweisung (SOP, Engl.: standard operating procedure) einer Standardproteinmischung und internem Standard (IS) werden relative Standardabweichungen (RSD%, Engl.: relative standard deviation [%]) von 1,2-3,1% erreicht [92]. Anstatt zu Färben können die Proteine auch auf einer Membran z.B. aus Nitrocellulose fixiert werden. Über die Reaktion mit Antikörpern können die fixierten Proteine sichtbar gemacht werden [93].

In der CGE werden die Kapillaren mit Gel gefüllt, welches entweder direkt in der Kapillare polymerisiert oder mit Druck in die Kapillare eingebracht wird. Die Probe wird wie in der SDS-PAGE vorbereitet und mithilfe der Injektionsvorrichtung des CE Instrumentes eingespritzt. Die Zeit der Trennung ist abhängig von der Molekülgröße der Proteine und liegt üblicherweise bei 60 min. Die Proteine werden online mit einem Detektor vermessen, d.h. aufwendige Färbeprozesse sind für eine Detektion nicht mehr nötig.

Wenn beide Methoden miteinander verglichen werden, so sind es die gleichen Argumente, die immer bei einem Vergleich zwischen Kapillar- und Gelelektrophorese hervorgebracht werden. Die Vorteile der Kapillarelektrophorese sind unabhängig der verwendeten Methode und werden beispielhaft für die Kapillargelelektrophorese in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Vor- und Nachteile von CGE und SDS-PAGE

Kapillargelelektrophorese	SDS-PAGE
Automatisation	arbeitsintensiv
Dauer einer Trennung : ca. 60 min	zeitaufwendig
Detektion direkt in der Kapillare	Färbung notwendig
Quantifizierung	Quantifizierung unter bestimmten Bedingungen möglich
hohes Auflösungsvermögen	
Messung der Molekülgröße	
Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist durch reproduzierbare Migrationszeiten und Peakflächen auch in langen Serien gegeben.	Gleichzeitig Analyse von mehreren Proben in einem Gel
Konzentration der Probe >0.1 mg/ml	Konzentration der Probe <0.1 µg/µl

2.5.3 Permanente und austauschbare Gele

Die ersten Substanzen, die als Gel in Kapillaren verwendet wurden, wurden direkt aus der Gelelektrophorese übernommen. Quervernetztes Polyacrylamid wurde direkt in der Kapillare polymerisiert [87, 88]. Solche Kapillaren halten allerdings nur bis zu 10 Trennungen und die Ergebnisse waren von Charge zu Charge nicht reproduzierbar [94]. Auch andere, permanente Gele, wie z.B. Agarose oder lineares Polyacrylamid, haben keine Verbesserung gezeigt. Erst die Anwendung von austauschbaren Gelen zeigte eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit. Als Substanzen können hierfür wasserlösliche, nur wenig verzweigte Polymere genutzt werden, die vor jeder Trennung erneuert werden. Verwendet wurden bisher lineares Polyacrylamid [94, 95], PEG [95], Polyethylenoxid (PEO) [35], Dextran [96] und modifizierte Cellulosen [35].

Für reproduzierbare Ergebnisse ist es teilweise nötig die Innenwand der Kapillare zu beschichten. Diese Maßnahme vermindert die Wechselwirkungen zwischen Wand und Proteinen. Bereits durch die Denaturierung der Proteine mit SDS sollte allerdings diese Wechselwirkung reduziert sein. Die Beschichtung vermindert ebenfalls die Stärke des EOFs. Für bestimmte Setups ist eine Unterdrückung des EOFs wichtig um alle Analyten zum Detektor zu führen. Statt einer permanenten kann man auch eine dynamische Beschichtung nutzen, in vielen Fällen können die austauschbaren Gelmatrizen als dynamische Beschichtung fungieren (z.B. Dextran, PEG) [35].

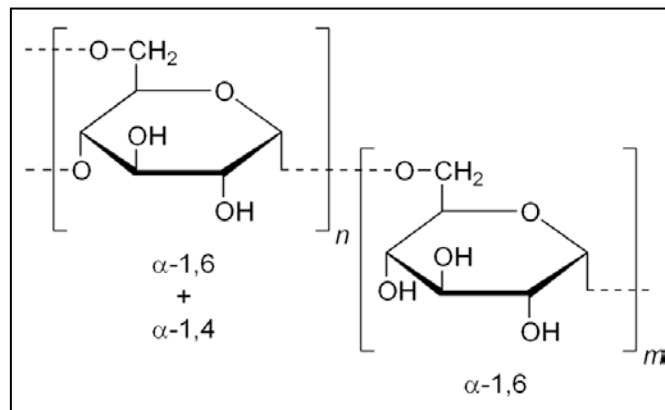


Abbildung 2-10: Strukturausschnitt des Dextrans, gezeigt sind α -1,4- und α -1,6-Verknüpfungen zu Nachbarmolekülen [55, 97]

Polysaccharide haben den weiteren Vorteil, dass sie wesentlich weniger UV-Licht absorbieren als Polyacrylamide. Eine Detektion von Proteinen ist dann bereits zwischen 205-220 nm möglich. Die kommerziell erhältliche Lösung für CGE enthält ebenfalls Dextran, laut Sicherheitsdatenblatt in einem Massenanteil <15% [98].

2.6 Einsatz von Internen Standards in der Kapillarelektrophorese

Standards werden zur quantitativen Bestimmung von Analysen benötigt. Das Europäische Arzneibuch unterscheidet die Externen- und die Internen-Standard-Methode für chromatographische Trennmethode [31]. Bei der Externen-Standard-Methode wird die Konzentration jedes Analyten durch Vergleich mit einer Referenzlösung erhalten. Bei einer Einpunkt-Kalibrierung kommt nur eine Referenzlösung, bei einer Mehrpunkt-Kalibrierung eine Konzentrationsreihe zum Einsatz [17]. In jedem Fall benötigt man die Analysesubstanz als Reinsubstanz, um die notwendigen Referenzlösungen herstellen zu können. Für jede zu bestimmende Komponente muss der sogenannte Responsefaktor berechnet worden sein, der den Zusammenhang zwischen Substanzmenge und Peakfläche darstellt. Für eine Mehrpunkt-Kalibrierung wird eine lineare Regression über die eingesetzten Substanzkonzentrationen und ihrer resultierenden Peakflächen berechnet. Die Steigung der

Regressionsgerade ist äquivalent dem Responsefaktor und beschreibt die Empfindlichkeit der Methode [17]. Für die Interner-Standard-Methode wird zusätzlich in allen Analysen- und Referenzlösungen ein interner Standard zugefügt. Vor den Berechnungen zur Externen-Standard-Methode werden die Verhältnisse der Peakfläche bestimmt [31]. Dies hat den Vorteil, dass Variationen zwischen einzelnen Messungen ausgeglichen werden können.

Auch wenn die Standardmethoden aus dem Arzneibuch für chromatographische Trennmethode beschrieben sind, können sie ebenfalls bei elektrophoretischen Trennungen genutzt werden. Der Einsatz von internen Standards wird für eine gute Präzision von quantitativen Bestimmungen in der Kapillarelektrophorese empfohlen [20, 99]. Allgemeine Anforderungen an einen internen Standard sind eine gute Löslichkeit und Stabilität in der Analysen- und Referenzlösung, eine hohe UV-Absorption bei der benötigten Wellenlänge, sowie keine oder nur eine geringe Toxizität. Dabei muss der interne Standard in guter Qualität auch über einen längeren Zeitraum zu kaufen sein [20, 99].

Neben der Korrektur von Dosierungsfehlern während der Injektion können ebenfalls Unterschiede in der Temperatur und in der Viskosität ausgeglichen werden. Verdünnungsfehler während der Probenvorbereitung und Verdunstungen aus dem Probenial können kompensiert werden. Wenn der Standard eine ähnliche chemische Struktur wie der Analyt besitzt, können Effekte, die z.B. Einfluss auf die Peakform haben, ausgeglichen werden. Variationen im Migrationsverhalten wirken sich sowohl auf Analyten als auch auf den internen Standard aus und kann durch den Bezug auf den internen Standard ebenfalls teilweise ausgeglichen werden. Von Vorteil ist für diese Korrektur, wenn der interne Standard nah am Analyten migriert, aber nicht mit diesem oder weiteren Komponenten komigriert. Damit eine Verlängerung der Analysenzeit vermieden wird, sollte der Standard eine kürzere Migrationszeit aufweisen. Insgesamt sollte der Standard, wenn in der Kapillaronenelektrophorese eingesetzt werden soll, eine vergleichbare Mobilität wie der Analyt zeigen, um Veränderung im EOF zu kompensieren. Für andere Methoden, wie z.B. CGE und CIEF gelten leicht andere Auswahlkriterien. So kann ein Standard für die CGE nach seiner Molekülgröße, einer für CIEF nach seinem isoelektrischen Punkt ausgesucht werden. Hasemann et al haben für die Mizellare elektrokinetische Chromatographie eine Auswahl an Standards zusammengestellt [99].

Die Konzentration des internen Standards sollte möglichst so gewählt werden, dass der zu analysierende Peak und der Peak des internen Standards eine ähnliche Fläche besitzen. Kann die Konzentration nicht frei gewählt werden, so sollte der IS möglichst einen S/N-Wert von größer 30 haben. Andernfalls können sich die Fehler aus Detektion und Peakintegration

zu sehr auf das Ergebnis des internen Standards auswirken. Die Präzision einer Methode kann also auch durch den IS verschlechtert werden.

Der interne Standard kann auch ohne eine externe Kalibrierung zum Einsatz kommen. Je nach Fragestellung ist keine Aussage über die Konzentrationen einer Substanz notwendig. Wenn der interne Standard doch hinzugefügt wird, können Aussagen über die Präzision einer Methode getroffen werden, in dem die Peakflächen-Verhältnisse von Analyten und internem Standard bewertet werden [3].

2.7 Einsatz der Kapillarelektrophorese im Arzneibuch

Die Kapillarelektrophorese wird bis jetzt nur sehr selten in der Analytik des Arzneibuches eingesetzt. Tabelle 2-3 listet die Häufigkeit von chromatographischen und elektrophoretischen Methoden auf, wie sie im Europäischen Arzneibuch, Auflage 7.2 vorkommen. Die Überlegenheit der Flüssigchromatographie in Form der HPLC und der Dünnschichtchromatographie ist deutlich in den Zahlen zu sehen. Die 21 Verweise auf die Monographie der Kapillarelektrophorese 2.2.47 setzen sich wie folgt zusammen:

- 6 Verweise in der Monographie 2.2.59 Glycan-Analyse von Glycoproteinen, die selbst allerdings im Arzneibuch noch nicht weiter im Gebrauch ist
- 10 Einsätze als Reinheitsprüfung, von denen zweimal die Enantiomerenreinheit mit CE getestet wird
- 5 Einsätze als Identitätsprüfung

Im US-amerikanischen Arzneibuch (USP, Engl.: The United States Pharmacopeia) wird nur Ropivacain mit der Kapillarelektrophorese auf Enantiomerenreinheit getestet [18, 26]. Im US-amerikanischen Arzneibuch findet man auch eine allgemeine Monographie, das General Chapter <1058>, welches die Notwendigkeit der Qualifizierung von analytischen Instrumenten, zu denen natürlich auch die Kapillarelektrophorese gehört, behandelt [32]. General Chapter, die eine Nummer größer als 999 haben, gelten nur als Empfehlung und sind nicht bindend.

Tabelle 2-3: Verwendung von komplexen, analytischen Methoden im Europäischen Arzneibuch [25]

2.2.29 Flüssigchromatographie	1484 Verweise
2.2.27 Dünnschichtchromatographie	960 Verweise
2.2.28 Gaschromatographie	352 Verweise
2.2.30 Ausschlusschromatographie	62 Verweise
2.2.31 Elektrophorese	30 Verweise
2.2.47 Kapillarelektrophorese	21 Verweise
2.2.55 Peptidmustercharakterisierung	13 Verweise
2.2.54 Isoelektrische Fokussierung	4 Verweise
2.2.55 Glycan-Analyse von Glycoproteinen	0 Verweise

Gegenüber der HPLC besitzt die CE einige Vorteile. Ihre Selektivität ist herausragend, genau wie die hohe Analysengeschwindigkeit [18]. Gut 90% der Substanzen des Europäischen Arzneibuches können geladen vorliegen, z.B. eine der Hauptvoraussetzungen für die Trennung mit der Kapillarzonenlektrophorese. Ein Problem scheint immer noch die geringere Sensitivität im Vergleich zur HPLC zu sein, die durch den wesentlich kürzeren Lichtweg und der geringeren Injektionsmenge bedingt ist. Die Sensitivität lässt sich mit Stacking-Techniken (Kapitel 2.3.3), erweiterten Detektorzellen oder anderen Detektoren (Massenspektrometer, Fluoreszenzspektrometer, Leitfähigkeitsdetektor, siehe dazu Kapitel 2.1.3) als UV-Vis-Detektoren erhöhen. Jedoch kann aufgrund des gegebenen Lichtwegs und der geringen Injektionsmenge nicht die Sensitivität einer HPLC erreicht werden [18]. Als weiteres Argument gegen die Kapillarelektrophorese in der Routine der pharmazeutischen Industrie werden Schwierigkeiten bei der Validierung von Methoden angeführt, die auf die schlechte Reproduzierbarkeit von Peakflächen und Migrationszeit zurückzuführen sind. Wenn man aber den Empfehlungen aus Referenz [19] folgt, so kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und damit auch die Validierbarkeit der Methode gesteigert werden.

Auch in der neuesten Auflage des Europäischen Arzneibuches fehlt für die Kapillarelektrophorese ein Kapitel über die Einstellung der Trennbedingungen. Für chromatographische Trennungen findet sich in Kapitel 2.2.46 der Abschnitt „Einstellen der Chromatographie-Bedingungen“. In diesem Kapitel werden die Ausmaße definiert, bis zu denen die verschiedenen Parameter variiert werden können. Ein vergleichbares Kapitel im Arzneibuch wäre eine der Voraussetzungen, damit die Kapillarelektrophorese weitere Verbreitung in der pharmazeutischen Industrie findet. Vorschläge für die einzelnen Parameter sind in Referenz [18] zusammengestellt.

In mehreren Bereichen bringt die Kapillarelektrophorese Vorteile mit. So ist die Trennung von Enantiomeren mithilfe von chiralen Selektoren mittlerweile bewährt [100]. Auch für die Reinheits- und Identitätsbestimmung von Proteinen gibt es vielfältige Möglichkeiten [101, 102]. Wenn man die Entwicklung auf dem Arzneimittelmarkt mit dem steigenden Anteil an biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln beobachtet [103], so wird in Zukunft die Kapillarelektrophorese stärker eingesetzt werden.

3 Temperaturmessung an der Kapillare

Die Temperatur ist in allen Zweigen der Naturwissenschaften und der Technik von grundlegender Bedeutung. Auf die Mehrzahl der physikalischen und chemischen Eigenschaften hat die Temperatur einen Einfluss und kann über diese Eigenschaften auch gemessen werden. Dabei beschreibt eine Messung immer die Zustandsgröße Temperatur [104].

Es gibt zwei grundsätzliche Möglichkeiten Temperatur zu messen. Zum einen kann die berührungsbehaftete Messmethode eingesetzt werden, bei der basierend auf dem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen Messgerät und zu messendem System auf die Temperatur geschlossen wird. Zum andern kann die Temperatur berührungsfrei über die Wärmestrahlungseigenschaften jedes thermodynamischen Systems ermittelt werden. Bei Wärmestrahlung handelt es sich um elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von $0,1 \mu\text{m}$ bis hin zu $1000 \mu\text{m}$ mit Frequenzen im Bereich von $3 \cdot 10^{11}$ bis $3 \cdot 10^{15}$ Hz (siehe auch Abbildung 3-1). Bei sehr heißen Körpern wie der Sonne strahlt die Wärme auch im Frequenzbereich von $<1000\text{nm}$ und damit im sichtbaren und ultravioletten Bereich. Mithilfe von optischen Verfahren können vorzugsweise im Infrarotbereich Temperaturen als Wärmestrahlung gemessen werden [105].

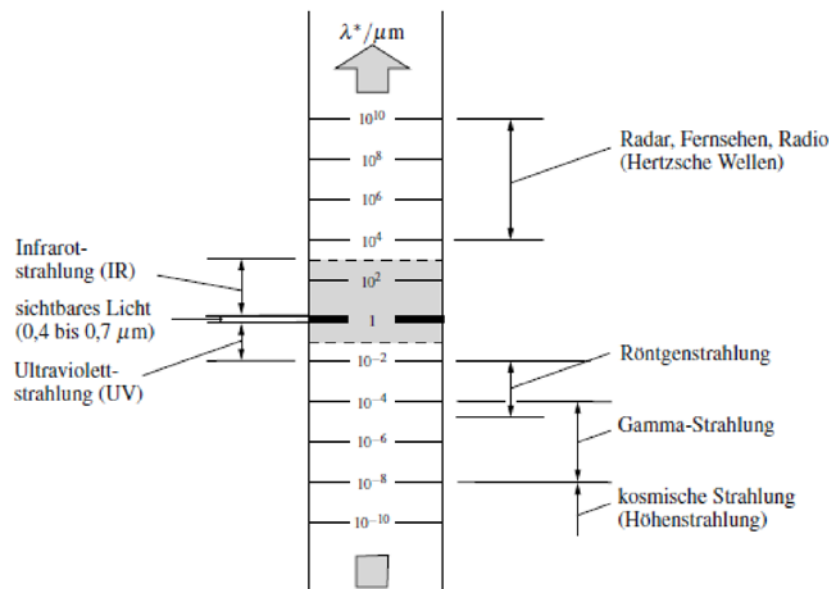


Abbildung 3-1: Elektromagnetisches Wellenspektrum aus [105], grau unterlegt: Wärmestrahlung

Die Stabilität und Richtigkeit der Temperatur während kapillarelektrophoretischer Trennungen sind wichtige Faktoren um qualitativ hochwertige Daten zu erhalten. Insbesondere die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen ist abhängig von einer gleichmäßigen

Temperatur innerhalb der Kapillare [106]. Allerdings messen kommerziell erhältliche CE-Systeme nur die Temperatur des Kühlungssystems. Viel interessanter ist aber, welche Temperatur in bzw. direkt an der Kapillare herrscht, um temperaturabhängige Fehlerquellen, wie z.B. die thermische Zersetzung von Analyten oder die Bildung von Gasblasen zu erkennen und zu vermeiden (siehe Abbildung 3-2). Hier können berührungsfreie Infrarotthermometer (IR-Thermometer) eingesetzt werden, welche die Temperatur an der Kapillaroberfläche messen können.

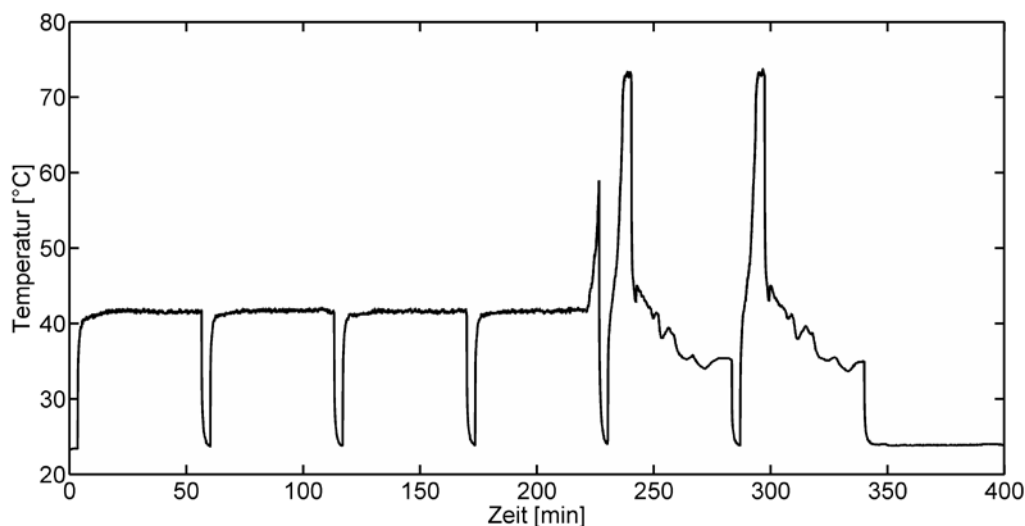


Abbildung 3-2: Aufnahme der Kapillaraußentemperatur innerhalb eines Zeitraumes, in dem der Elektrolyt (Borat-Puffer, 0,5 mol/l, pH 8,5) bei einer angelegten Spannung von 30kV innerhalb der Kapillare in der PrinCE 550 CE kochte

3.1 Temperaturmessung im Infrarotbereich

Jeder Körper, der eine Temperatur über den absoluten Nullpunkt hat, sendet Wärme in Form von Infrarotstrahlung aus. Dabei hängt die Strahlungsintensität unter anderem von der Temperatur ab. Zum Beispiel senden Körper mit einer absoluten Temperatur von 300-500 K im Wellenlängenbereich von 8-14 μm besonders stark. Gleichzeitig mit Wärmestrahlung treten häufig andere, leitungsbasierte Formen der Wärmeübertragung auf [105, 107].

Der Idealfall hat man einen sogenannten Schwarzen Körper, der die maximal mögliche Energie emittiert. Einstrahlende Energie wird von einem idealen Körper vollständig absorbiert und es findet weder eine Transmission noch eine Reflexion der Energie statt. Nur der Schwarze Körper strahlt Wärme unabhängig von Oberflächen- und Materialeigenschaften ab, so dass sich bei jeder festgelegten Wellenlänge eine mit der Temperatur monoton ansteigende Funktion ergibt. Allerdings sind Körper normalerweise keine Schwarzen Strahler, sondern sogenannte Graue Strahler. Ihre Intensität der Strahlung ist

materialabhängig und somit geringer als beim idealen Strahlungsverhalten. Dabei wird einstrahlende Energie nur teilweise absorbiert, ein Teil kann sowohl reflektiert als auch bei transparenten Materialien transmittieren [105].

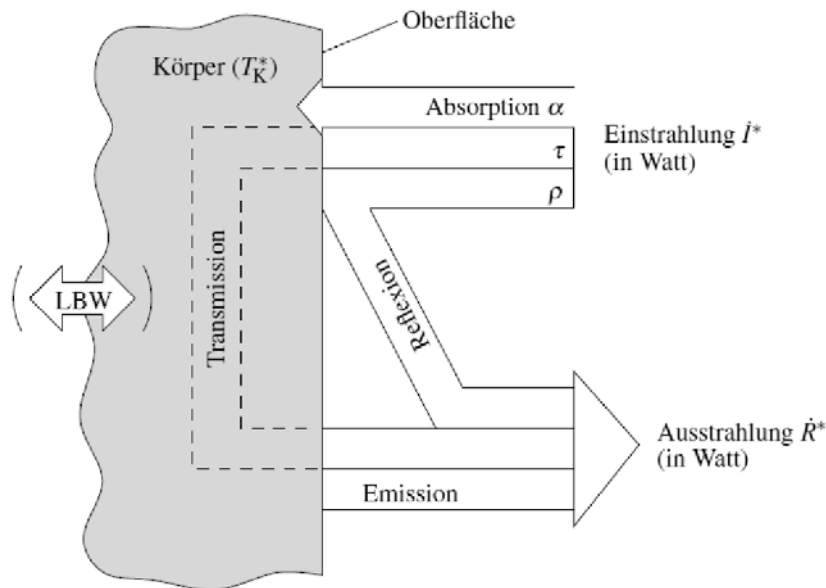


Abbildung 3-3: Schematische Globalbilanz der Wärmestrahlung aus [105], LBW: leitungsbasierte Wärmeübergänge

Abbildung 3-3 fasst die verschiedenen Strahlenarten zusammen, dabei müssen nach Definition die Absorption α , die Transmission τ und Reflexion ρ in Summe den Wert eins ergeben. Für Schwarze Körper sind sowohl Transmission τ und Reflexion ρ gleich null, somit sind die Absorption und die Emission gleich eins. Mit Hilfe von Detektoren für Wärmestrahlung kann die Strahlungsintensität mit der Temperatur des Körpers in Beziehung gesetzt werden [105]. Um auch für nicht ideale Strahlungen von Grauen Körpern die Temperatur zu messen, muss der Emissionsgrad ε bestimmt werden. Dieser ist materialspezifisch und bezieht sich auf einen Vergleich mit dem Strahlungsverhalten von Schwarzen Körpern. In einer Vergleichsmessung, wie sie auch in Kapitel 8.3.4 beschrieben wird, wird der Emissionsgrad bestimmt und beinhaltet alle beschriebenen Abweichungen von Grauen Körpern. Für den Emissionsgrad von Kapillaren wurde ein Wert von 0,96 bestimmt. Dies ist ein typischer Wert für opake Kunststoffe, die der äußeren Polyimid-Beschichtung ähneln (Anhang der Referenz [108]).

Als Infrarotdetektoren dienen üblicherweise thermische Sensoren, welche die einstrahlende Energie absorbieren und in ein elektrisches Signal umwandeln können. Ihre Ansprechzeit liegt im Bereich von Millisekunden, wohingegen Quantendetektoren um einige Größenordnungen schneller arbeiten. Diese benötigen jedoch zusätzlich eine Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Vor dem IR-Sensor fokussiert eine Optik die vom Objekt ausgehende Strahlung auf das Detektorelement. Das erzeugte, elektrische Signal wird dann durch eine

Elektronikeinheit verstärkt und weiterverarbeitet. Das Display bzw. ein angeschlossener Computer mit passender Software zeigt dann den gemessenen Wert an. In Abbildung 3-4 ist der schematische Aufbau eines Infrarotthermometers dargestellt [105, 107].

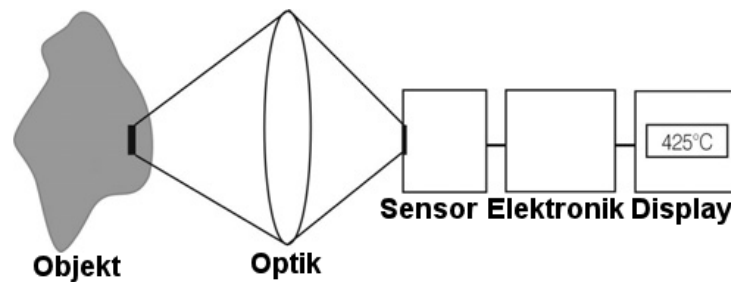


Abbildung 3-4: Aufbau eines Infrarotthermometer aus [107]

Die einfache Bedienung und die universelle Einsetzbarkeit sind zwei besondere Vorteile von IR-Thermometern. Da aber jeder Gegenstand mit einer Temperatur über 0 K IR-Strahlung aussendet, muss sehr genau auf die richtige Positionierung des Thermometers vor dem zu messenden Gegenstand geachtet werden. Dies stellt wohl den größten Nachteil der Temperaturmessung über die Wärmestrahlung dar. Auch die Messung durch Fenster oder strahlungsabsorbierende Umgebung ist fehlerbehaftet [107].

Tabelle 3-1: Parameter des IR-Thermometers optris® CT LT mit CF-Vorsatzlinse [108]

Temperaturbereich	-50°C bis 975°C
Spektralbereich	8-14 µm
Optische Auflösung	22:1
Datenrate	1 Hz
Messentfernung	10 mm
Durchmesser des Messflecks	0,6 mm
Temperaturauflösung	0,1°C
Systemgenauigkeit	±1°C
Ansprechzeit	150 ms
Maße Messkopf	28 x 14 mm
Maße Vorsatzlinse	11 x 14 mm

Für die Aufgabe, Temperaturen an der Kapillaroberfläche zu messen, mussten verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Zum einen ist der Außendurchmesser einer Kapillare meist nur 375 µm groß, daher wurde eine sehr kleine optische Auflösung des Thermometers benötigt. Desweiteren sollten auch die Werte für Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messung möglichst niedrig sein. Diese Eigenschaften besitzt das gewählte IR-Thermometer optris® CT LT (Optris GmbH, Berlin, Deutschland). Tabelle 3-1 fasst die wichtigsten Parameter des IR-Thermometers aus Referenz [108] zusammen. Der Bereich, in dem das Thermometer messen kann, ist mit -50 bis 975°C sehr groß. Der voreingestellte

Wellenlängenbereich ist allerdings für die Messung von 300-500 K, also ca. 20-230°C, optimal [105]. Die genutzte Datenrate ist 1 Hz, aber das IR-Thermometer kann auch mit wesentlich höheren Frequenzen von bis zu 1000 Hz Daten messen [108].

3.2 Einbau des IR-Thermometers

Ein Vorteil des IR-Thermometer optris® CT LT sind die kleinen Maße seines Messkopfes und die separate Elektroneinheit. So musste nur der Messkopf innerhalb des Ofenraums Platz finden, die Elektroneinheit lag außerhalb des CE-Gehäuses (siehe Abbildung 3-5). An die Elektroneinheit wurde eine USB-Steckverbindung eingebaut, so dass das Thermometer über einen PC oder Notebook mit der Software CompactConnect 1.6.1 gesteuert, die gemessenen Werte verarbeitet und gespeichert werden konnten.

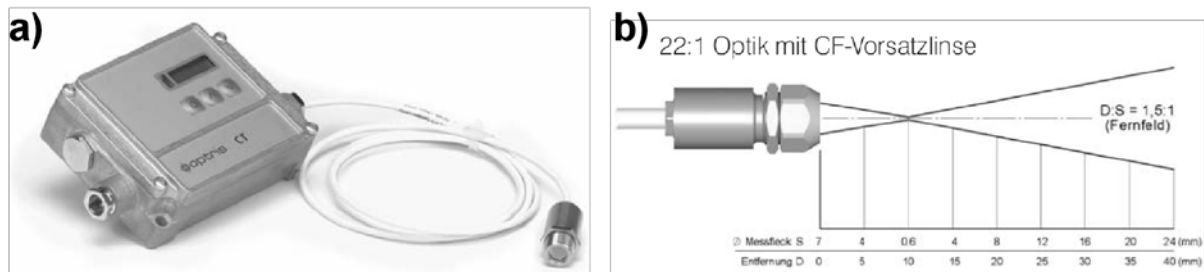


Abbildung 3-5: IR-Thermometer optris® CT LT a) mit CF-Vorsatzlinse und Elektroneinheit; b) Optisches Diagramm [108]

Abbildung 3-5b zeigt auch, dass nur in einem sehr schmalen Bereich der Messfleck klein genug für die Kapillare ist. Bei einem Abstand von 10 mm fokussiert die Optik auf einen Messfleck mit einem Durchmesser von 0,6 mm. Eine Kapillare mit einem Außendurchmesser von 0,375 mm füllt diesen zu 72% aus. Bereits kleinste Veränderungen im Abstand führen zu einer Vergrößerung des Messflecks und einer schlechteren Ausnutzung. Als Abstandshalter wurde ein Aufsatz gebaut, in dem die Kapillare fest sitzt und der Abstand zwischen Thermometer und Kapillare exakt bestimmt werden kann. In Abbildung 3-6a ist der Aufsatz schematisch dargestellt. Da alle Längen der einzelnen Teile bekannt sind, kann von d' auf d geschlossen werden. Mit einer Messlehre wurde vom Ende des IR-Thermometers bis zum Aufsatz gemessen, so dass die exakte Distanz d zwischen IR-Thermometer und Kapillare bestimmt wurde.

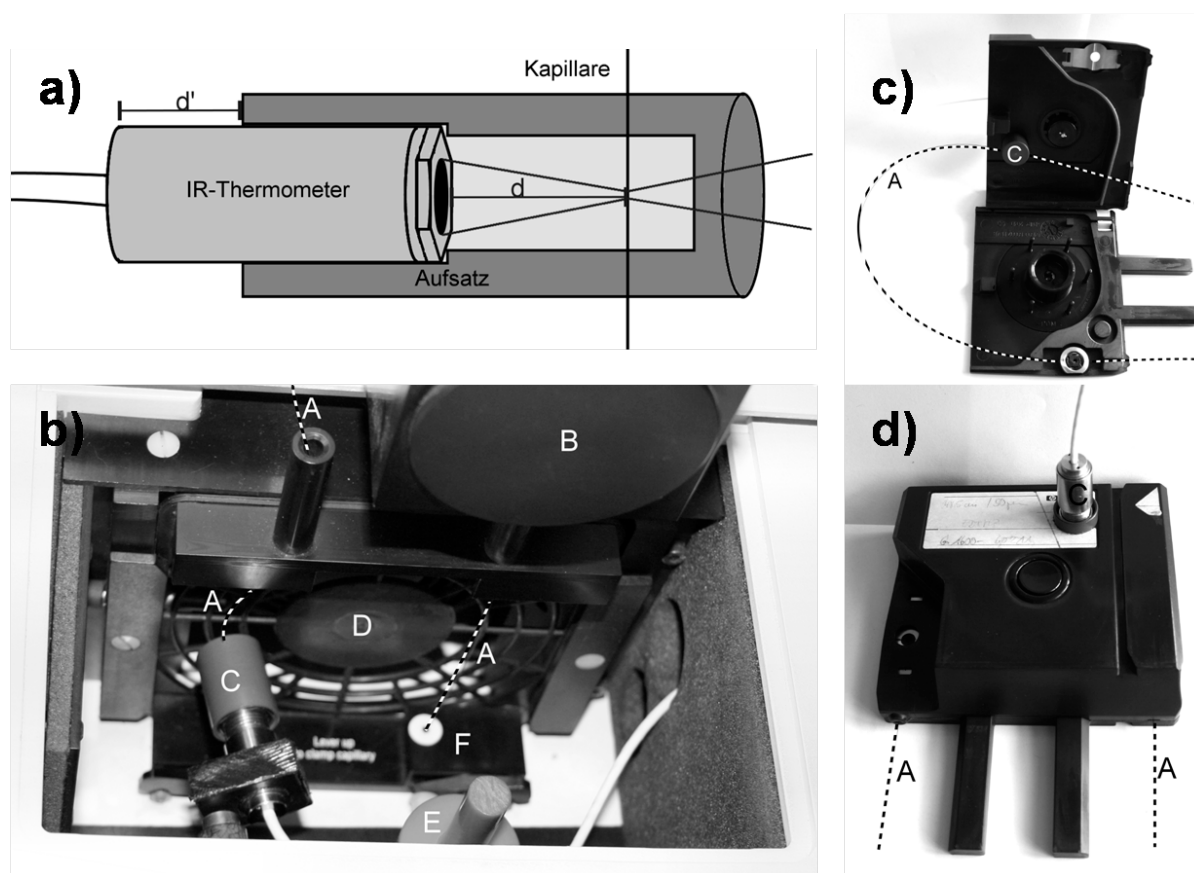


Abbildung 3-6: Messaufbau des IR-Thermometers; a) Schema des Aufbaus mit IR-Thermometer, Aufsatz zum Messen, und der Kapillare; b) Blick in den Ofenraum der PrinCE 550 CE mit montierter Kapillare (A) und IR-Thermometer (C), weitere Details werden im Text erläutert; c) Offene Kassette für die Agilent 1600 CE mit Kapillare (A) und Aufsatz (C); d) Geschlossene Kassette für die Agilent 1600 CE mit Kapillare (A) und installiertem Thermometer (C)

3.2.1 Einbau in die PrinCE 550 CE

Für den Einbau des IR-Thermometers in der PrinCE 550 CE ist eine zusätzliche Fixierung notwendig (Abbildung 3-6b mit E gekennzeichnet). Diese hält das Thermometer (C) in einer festen Position vor dem Lüfter (D). Die Kapillare (A) (nachgezeichnet zur besseren Erkennung) wird im Detektor (B) und in der Verbindung (F) zum Inlet montiert, durch den Aufsatz des IR-Thermometers (C) und in die Verbindung zum Outlet-Vial darunter geführt. Danach wird das Thermometer in den Aufsatz gesteckt und mit der Messlehre der richtige Abstand eingestellt. Das Kabel zur Elektroneinheit wird an der Seite des Ofenraums durch eine Öffnung geführt, die üblicherweise für die Kopplung mit Massenspektrometern genutzt wird.

3.2.2 Einbau in die Agilent 1600 CE

Für den Einbau des IR-Thermometers in eine Agilent 1600 CE musste in eine Kapillarkassette ein Loch mit dem Außendurchmesser des Aufsatzes gebohrt werden (siehe Abbildung 3-6c-d). Durch dieses Loch wird der Aufsatz (C) geschoben. Die Kapillare wird durch den Aufsatz gefädelt und in der Kassette befestigt. Nachdem die Kassette verschlossen wurde, kann das IR-Thermometer in den Aufsatz gesteckt werden und die richtige Position des Thermometers mit einer Messlehre eingestellt werden. Die Kassette wird in der CE eingebaut und das Verbindungskabel zur Elektronik durch die Öffnung für MS-Kassetten geführt.

3.3 Datenauswertung

Für die Datenauswertung wurden Spannung und Stromstärke zusätzlich zu den Daten des IR-Thermometers aufgezeichnet. Die Software Chemstation*Plus* (Rev.A.08.03) steuert die Agilent 1600 CE und kann während der Trennung neben mehreren Wellenlängen und ganzen Spektren auch noch weitere Parameter wie Spannung, Strom, Leistung, Temperatur des Kühlungssystems und den Druck aufnehmen. Die Ergebnisse lassen sich als CSV-Dateien exportieren und mit Matlab[®] weiterverarbeiten. Die Steuerungssoftware zur PrinCE 550 CE, DAX Data Acquisition & Analysis Version 8.0, kann dies hingegen nicht. Das Programm zeigt zwar die aktuellen Werte für Spannung und Strom an, sowie die aktuelle Temperatur des Kühlsystems, aber es hat keine Funktion, die diese Werte aufnehmen könnte. Um dennoch die nötigen Informationen über Spannung und Stromstärke zu erhalten, wurde während der Trennung der PC-Desktop in dem Abschnitt per Desktopvideo aufgenommen, in dem die Echtzeitdaten der CE gezeigt wurden. Die Videos vom Typ „*.avi“ wurden mit dem Skript „temperkenn“ (siehe Kapitel 10.1.1.1) ausgewertet und in eine Tabelle übertragen. Die Datenrate wurde für alle Aufnahmen – Temperatur, Spannung und Stromstärke – und für beide CE-Systeme auf 1 Hz festgelegt, da die limitierende Datenrate die des Desktopvideos ist. Die Datenrate des IR-Thermometers lässt sich beispielsweise in der Software CompactConnect einstellen. Falls unterschiedlichen Datenraten genutzt wurden, müssen die Daten auf einen gemeinsamen Nenner skaliert werden. Abbildung 3-7 zeigt, wie sich das Anlegen von Spannung auf Stromstärke und Temperatur auswirkt. Deutlich ist zu sehen, dass die Temperaturänderung sich gleichsinnig mit der Stromstärke verhält.

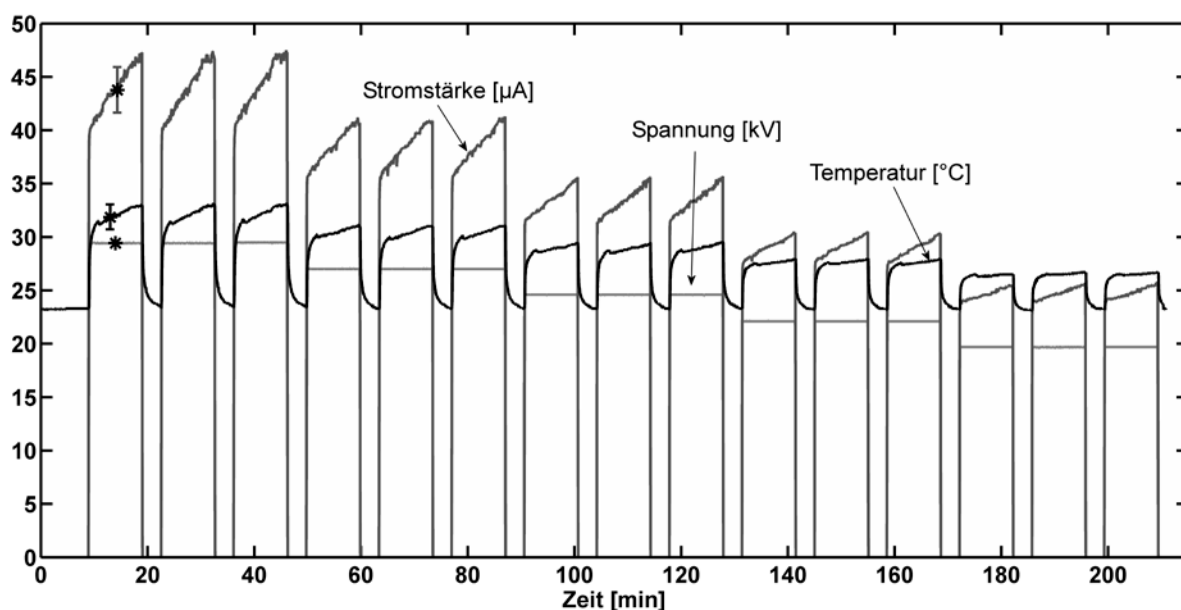


Abbildung 3-7: Diagramm der angelegten Spannung, der zugehörigen Stromstärke und der resultierenden Temperatur; Für das Beispiel wurde ein Phosphatpuffer (0,050 mol/l, pH 6) in der PrinCE 550 CE genutzt und fünf verschiedene Spannungswerte von 20-30 kV angelegt. Im ersten Lauf sind zusätzlich die nach Kapitel 3.3 berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen eingezeichnet.

Die Tabellen, die die Daten wie in Abbildung 3-7 dargestellt enthalten, wurden mithilfe des Matlabskripts „Temperaturmessung“ ausgewertet (siehe Kapitel 10.1.1.2). Eine Funktion im „shape-preserving modus“ wird über die Daten berechnet und die 1. Ableitung gebildet. Überschreitet die Steigung, also die Werte der 1. Ableitung, einen vorher festgelegten Grenzwert, deutet dies auf den Anstieg des Parameters (Temperatur, Spannung oder Stromstärke) am Anfang einer Trennung hin. Über die Zeit der Trennung werden dann der Mittelwert und die Standardabweichung des Parameters berechnet. In Abbildung 3-7 sind diese Werte beispielhaft für die erste Trennung mit eingezeichnet. Abhängig von der Fragestellung wurden zusätzlich noch Berechnungen von Temperaturen nach den Referenzen [109] und [58] durchgeführt. Dafür wurden Elektropherogramme mit einem EOF-Marker benötigt, die integriert und deren Migrationszeiten ausgewertet wurden. Die Rechenwege sind in Kapitel 3.6 näher beschrieben.

Gleichung 12 (Kapitel 2.2.3) beschreibt die Berechnung der Leistung aus Spannung und Stromstärke. Da verschiedene Kapillarlängen zum Einsatz kamen, muss die Leistung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse noch auf die Kapillarlänge normiert werden (Gleichung 18).

$$\frac{P}{L} = \frac{U * I}{L}$$

Gleichung 18: Berechnung der Leistung pro Länge

Die Leistung pro Längeneinheit und die Temperatur hängen strikt linear voneinander ab [60, 110]. Deutlich zu sehen ist dies unter anderem in der Abbildung 3-15 und an den

Bestimmtheitsmaßen der linearen Regression, wie z.B. in Tabelle 3-2. Für ganze Serien kann dann die Steigung der linearen Funktion zur Charakterisierung des Zusammenhangs dienen.

3.4 Vergleich unterschiedlicher Kapillaren

Als Parameter sollten zuerst der Innendurchmesser und die Beschichtung von Kapillaren und deren Einfluss auf die Entstehung von Wärme untersucht werden. Jedes Material hat eine eigene Konstante, die spezifische Wärmeleitfähigkeit mit der Einheit $[W \cdot K^{-1} \cdot m^{-1}]$, die beschreibt, wie gut oder schlecht das Material Wärme weiterleiten kann. Allerdings bezieht sich der Wert nur auf die Leitung der Wärme und nicht auf den Wärmetransport durch Konvektion oder Wärmestrahlung [105]. Gemeinsam mit der Information über die Dicke des Materials lässt sich die Weiterleitung der Wärme berechnen, wie sie beispielsweise in Abbildung 2-7 für eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von $74 \mu m$ und einem Außendurchmesser von $362,8 \mu m$ dargestellt ist. Referenzwerte für die Wärmeleitfähigkeit für unterschiedliche Kapillaren sind in dem Artikel von Evenhuis et al. zusammengefasst ([109] und Referenzen darin).

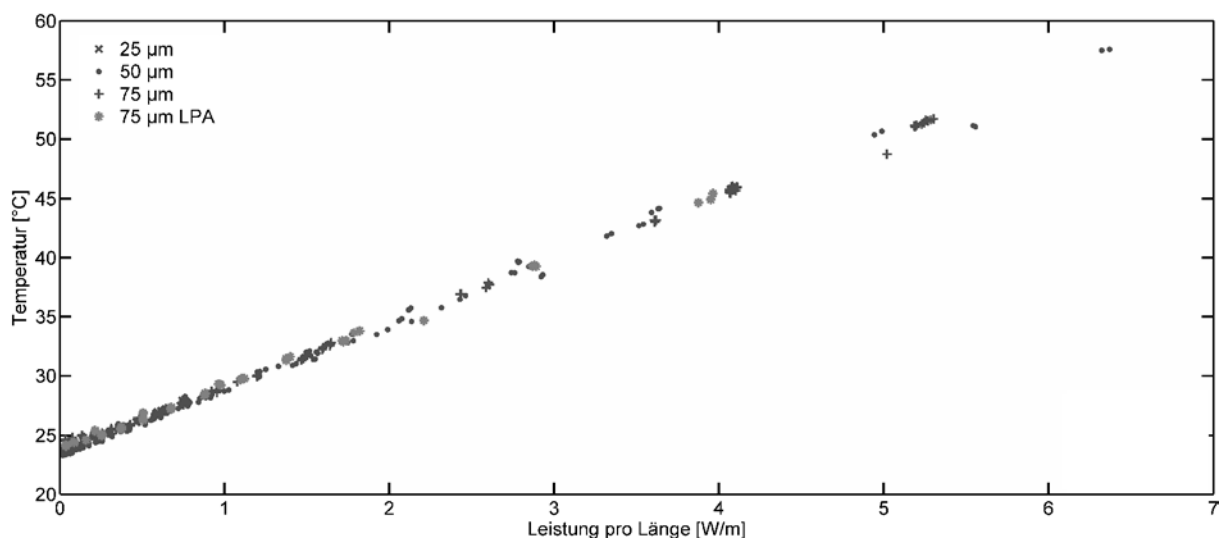


Abbildung 3-8: Leistung pro Länge gegen Temperatur der vier verschiedenen Kapillaren mit einer vergrößerten Darstellung des häufig genutzten Bereiches bis 2 W/m

Kapillaren mit den häufig genutzten Innendurchmessern von 50 und 75 μm , sowie die ebenfalls im Institut genutzten Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 μm und einem Innendurchmesser von 75 μm mit zusätzlicher Innenbeschichtung mit linearem Polyacrylamid wurden in die PrinCE 550 CE eingebaut. Verschiedene Puffer und Spannungen wurden appliziert (siehe Kapitel 8.3). Abbildung 3-8 zeigt alle gemessenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Leistung pro Länge. Die Daten der verschiedenen Kapillartypen liegen sehr nah beieinander, besonders im Bereich unter 2 W/m.

Als Ergebnis konnte für jeden Kapillartyp eine lineare Funktion berechnet werden. Für eine bessere Übersicht sind die Funktionen nicht in Abbildung 3-8 eingezeichnet, sondern in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Diese Versuchsreihe wurde allerdings vor der Optimierung des Abstandes durchgeführt, die in Kapitel 3.5 beschrieben wird. Der Abstand zwischen Thermometer und Kapillare betrug hier die vom Hersteller empfohlenen 10 mm. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.5 zeigen aber, dass der Verlauf der Temperatur steiler und damit die Steigung größer sein müsste. Dies gilt natürlich für alle Kapillartypen. Da hier ein Vergleich unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, kann man die abschließenden qualitativen Aussagen auch ohne Anwendung des optimierten Abstandes annehmen.

Tabelle 3-2: Funktionen der linearen Regression für die verschiedenen Kapillaren

Kapillare	Funktion der linearen Regression	Bestimmtheitsmaß R^2
25 μm	$T = 5,22 * \frac{P}{L} + 23,74$	0,992
50 μm	$T = 5,42 * \frac{P}{L} + 23,46$	0,996
75 μm	$T = 5,29 * \frac{P}{L} + 23,92$	0,998
75 μm LPA	$T = 5,36 * \frac{P}{L} + 23,84$	0,999

Die Parameter der Funktionen, die Steigung und der y-Achsenabschnitt, sehen auf den ersten Blick sehr ähnlich aus. Um dies zu bestätigen, wurde eine eingehendere, statistische Analyse der linearen Regression berechnet.

3.4.1 Statistische Analyse und Vergleich der linearen Regressionsparameter

Für einen Vergleich von zwei Stichproben ist die übliche Vorgehensweise die „Prüfung auf Varianzhomogenität“, auch F-Test genannt, und daran anschließend einen Mittelwertvergleich der Stichprobe (t-Test) [111]. Da in dieser Fragestellung allerdings Funktionen einer linearen Regression miteinander verglichen werden sollen, müssen einige Besonderheiten beachtet werden [112]. In einem ersten Schritt werden die Varianzen für die lineare Regression berechnet. Analog zu den Hypothesen in Referenz [112], Unterkapitel 1.4, kann dann zuerst ein F-Test mit der Fehlervarianz berechnet werden. Je nach Aussage dieses Testes wird dann ein t-Test oder ein Welch-t-Test für weitere Parameter der linearen Regression berechnet.

3.4.1.1 Varianzen der linearen Regressionsparameter

Die allgemeine Gleichung der linearen Regression und die dazugehörige Schätzfunktion sind nachfolgend dargestellt.

$$y_i = \alpha + \beta * x_i + e_i$$

x_i, y_i Wertepaar

α Absolutglied / y-Achsenabschnitt

β Steigungsparameter

e_i zufälliger Fehler

Gleichung 19: Allgemeine Gleichung der linearen Regression

$$\hat{y} = a + b * x$$

x, \hat{y} Wertepaar mit definiertem x und geschätzten \hat{y}

a Punktschätzung für das Absolutglied

b Punktschätzung für den Steigungsparameter

Gleichung 20: Schätzungsfunktion der linearen Regression

Für die zwei Gleichungen gilt, dass a und b als Kleinste-Quadrat-Schätzer für α als y-Achsenabschnitt und β als Steigung stehen. Der zufällige Fehler wird als e_i bezeichnet. Varianzen kann man für die zwei Schätzer als auch für den zufälligen Fehler berechnen. Dabei sind die Varianzen der Kleinste-Quadrat-Schätzer von der Varianz des zufälligen Fehlers abhängig. Diese wird nach Gleichung 21 berechnet [112].

$$s^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - a - b * x_i)^2}{n - 2} = \sum_{i=1}^n \frac{\hat{e}_i^2}{n - 2}$$

s^2 Varianz des zufälligen Fehlers einer linearen Regression

n Anzahl

\hat{e}_i geschätzte Fehler

Gleichung 21: Schätzen der Varianz s^2 des zufälligen Fehlers einer linearen Regression

Anhand der Varianz des zufälligen Fehlers können die Varianzen der Schätzer a und b nach den nachfolgenden Gleichungen berechnet werden.

$$s_a^2 = \left(\frac{\frac{1}{n} + \bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right) * s^2$$

s_a^2 Varianz des y-Achsenabschnitts a

\bar{x} Mittelwert der x -Werte

Gleichung 22: Schätzen der Varianz des y-Achsenabschnitts a

$$s_b^2 = \frac{s^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

s_b^2 Varianz der Steigung b

Gleichung 23: Schätzen der Varianz der Steigung b

3.4.1.2 F-Test

Der F-Test für den Vergleich von Funktionen einer linearen Regression nutzt die Fehlervarianz s^2 [112]. Jeder Kapillartyp wurde mit allen anderen Kapillartypen verglichen, so dass sich insgesamt 6 Vergleiche ergaben. Für jeden Vergleich wurde $F_{\text{Prüf}}$ nach Gleichung 24 berechnet und gegen einen tabellierten Wert getestet. Dieser kann sowohl in Matlab® als auch in Excel® mit der Funktion finv bzw. FINV erzeugt werden. Für dieses Problem war die Handhabung der großen Datenmenge in Matlab® leichter. In Kapitel 10.1.1.3 wird das genutzte Skript kommentiert. Für die Auswahl des tabellierten Wertes F_{Tab} benötigt man die Freiheitsgrade von Nenner- und Zählervarianz und muss ein Signifikanzniveau festlegen. Dieses ist für den paarweisen Vergleich $\alpha=5\%$.

$$F_{\text{Prüf}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ mit } s_1 > s_2$$

$F_{\text{Prüf}}$ Prüfwert eines F-Testes

s_1, s_2 zu vergleichende Varianzen

Gleichung 24: Berechnung von $F_{\text{Prüf}}$

Gilt $F_{\text{Prüf}}$ ist kleiner als F_{Tab} , dann wird die Nullhypothese H_0 , die in diesem Fall „Gleichheit der Varianzen“ bedeutet, beibehalten. Im gegensätzlichen Fall, wenn $F_{\text{Prüf}}$ größer als F_{Tab} ist, muss die Nullhypothese verworfen werden und die Alternativhypothese H_1 „Die Varianzen sind signifikant unterschiedlich.“ angenommen werden.

Der F-Test für die lineare Regression, der die Fehlervarianzen untersucht, stellt eindeutig für alle Vergleiche der vier verschiedenen Kapillartypen untereinander signifikante Unterschiede fest. Dieses Ergebnis führt im nächsten Schritt dazu, dass ein Welch-t-Test für unverbundene Stichproben bei ungleichen Varianzen durchgeführt werden muss [111].

3.4.1.3 Welch-t-Test

Üblicherweise werden mit einem t-Test die Mittelwerte von zwei Stichproben miteinander verglichen, aber auch die Parameter einer linearen Regression lassen sich auf ihre Unterschiede untersuchen [112]. In die allgemeine Gleichung des Welch-t-Testes (Gleichung 25) wird dann statt den Mittelwerten die Parameter der linearen Regression, also entweder

die Steigung bzw. der y-Achsenabschnitt eingesetzt. Als Varianzen werden diejenigen eingesetzt, die nach Gleichung 22 bzw. nach Gleichung 23 in Kapitel 3.4.1.1 berechnet wurden.

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}$$

$t_{\text{Prüf}}$ *Prüfwert eines t-Testes*

Gleichung 25: Berechnung von $t_{\text{Prüf}}$

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, wird auch der berechnete Wert $t_{\text{Prüf}}$ gegen einen tabellierten Wert t_{Tab} getestet. Die Funktion zur Erstellung dieses Wertes sind in Matlab® und Excel® `tinv` bzw. `TINV`. Neben dem Signifikanzniveau muss der Freiheitsgrad angegeben werden. Die F-Verteilung ist darauf ausgelegt, F-Werte aus zwei verschiedenen Freiheitsgraden zu berechnen, die t-Verteilung kennt nur einen Freiheitsgrad. Mit Gleichung 26 kann ein Freiheitsgrad bei unterschiedlicher Anzahl der Stichprobe berechnet werden.

$$f = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}}$$

f *Freiheitsgrad*

Gleichung 26: Berechnung des Freiheitsgrades f für einen Welch-t-Test

Das Signifikanzniveau wurde wie bereits für den F-Test auch für den Welch-t-Test im paarweisen Vergleich auf 5% festgelegt. Wenn $t_{\text{Prüf}}$ kleiner als t_{Tab} ist, so gilt, dass die Unterschiede in der Steigung bzw. im y-Achsenabschnitt zufällig sind (Nullhypothese H_0). Die Alternativhypothese H_1 wird angenommen, wenn $t_{\text{Prüf}}$ größer als t_{Tab} ist, d.h. die Unterschiede in der Steigung bzw. y-Achsenabschnitt signifikant sind.

Auch der Welch-t-Test sagt eindeutig aus, dass alle Funktionen der verschiedenen Kapillartypen signifikante Unterschiede sowohl im y-Achsenabschnitt, als auch in der Steigung zeigen.

3.4.1.4 Interpretation

Obwohl auf den ersten Blick in Tabelle 3-2 die Unterschiede der Funktionen nicht sonderlich groß sind und auch in Abbildung 3-8 kaum Unterschiede zu sehen sind, so sagen sowohl F- als auch t-Test aus, dass die Unterschiede signifikant sind. Besonders die präzise Messung

des IR-Thermometers führt zu sehr kleinen Varianzen der linearen Regressionsparameter. Dies führt zu den signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Kapillartypen. Allerdings ist eine maximale Differenz von 3% in der Steigung nicht relevant, denn eine Auswirkung auf die Trennung ist bei dem Unterschied nicht wahrscheinlich. Vor allem die äußere Geometrie der Kapillare ist maßgeblich für die Wärmeabgabe, diese ist für alle untersuchten Kapillaren dieselbe. Wenn der gleiche Puffer und die gleiche Spannung bei Kapillaren mit unterschiedlichen Innendurchmessern angewendet werden, so kann eine größere Joulesche Wärme in weiteren Kapillaren gemessen werden. Diese ist aber auf die ebenfalls größere Leistung pro Länge zurückzuführen. Dies führt zum gleichen Anstieg der Temperatur unabhängig des Innendurchmessers. Anhand der erzeugten Leistung in einer Kapillare kann man so den zu erwartenden Temperaturanstieg abschätzen.

3.5 Optimierung des Abstandes

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, ist der Abstand zwischen Thermometer und Kapillare ein kritischer Parameter. Laut dem optischen Diagramm aus Abbildung 3-5b sollte der kleinste Messfleck bei einer Distanz von 10 mm sein. Allerdings zeigte sich bei der Variation des Abstandes, dass die Distanz optimiert werden kann. Auch bei Thermometern und optischen Detektoren können die wahren Werte von den Spezifikationen des Herstellers abweichen.

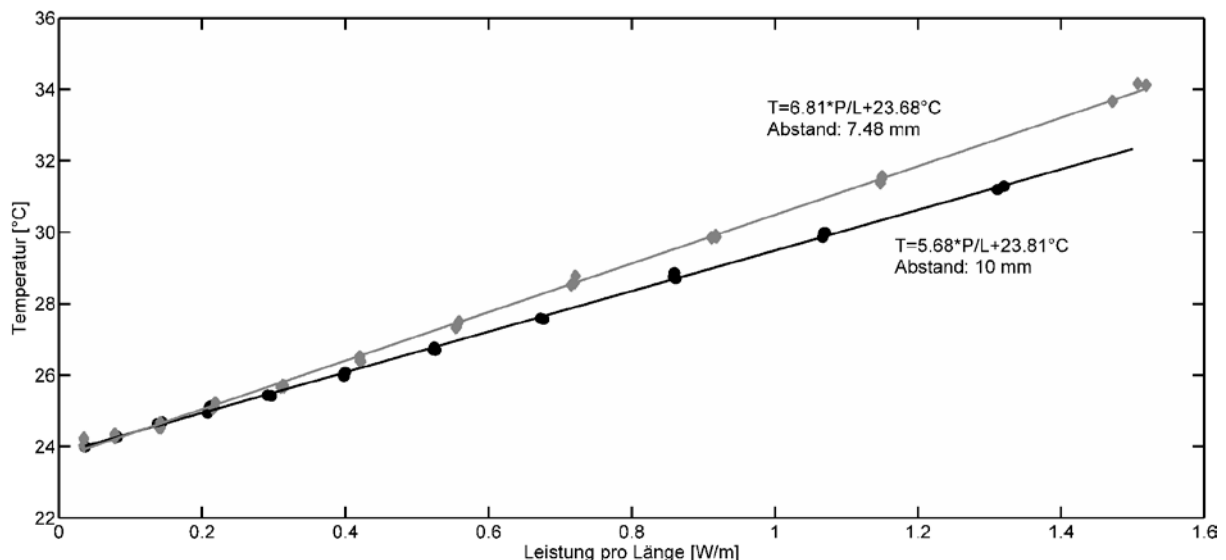


Abbildung 3-9: Leistung pro Länge gegen die Temperatur, gemessen bei zwei verschiedenen Abständen

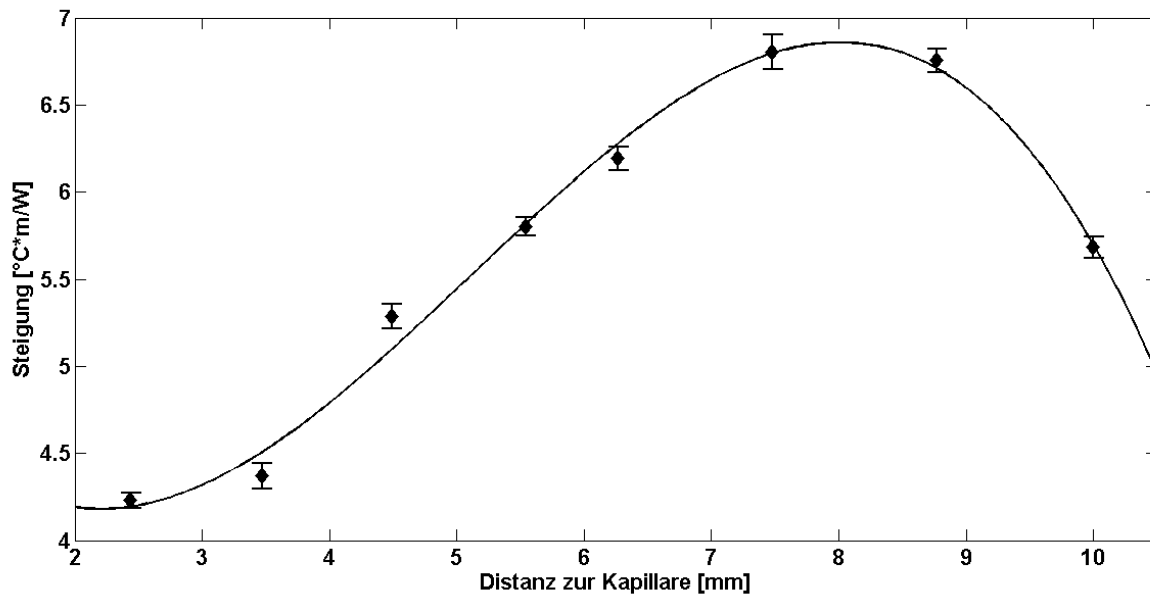


Abbildung 3-10: Variation des Abstandes zwischen IR-Thermometer und Kapillare

Abbildung 3-9 zeigt deutlich, dass unter gleichen Versuchsbedingungen und geändertem Abstand die Steigung der linearen Regression größer wird. Insgesamt wurden acht Serien vermessen, die jeweils einen Abstand zwischen Kapillare und IR-Thermometer von 2,5-10 mm hatten. Für jeden Abstand wurde eine Serie mit einem Phosphatpuffer (0,02 mol/l, pH 8) und unterschiedlichen Spannungen durchgeführt. Die resultierenden Temperaturen wurden gegen die angelegten Leistungen pro Längen aufgetragen und die Steigung der linearen Funktion berechnet. In Abbildung 3-10 sind alle Steigungen gegen den Abstand aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Steigung abhängig von dem Abstand und optimal für einen Abstand von 8 mm ist. Zur Verdeutlichung der Optimierung wurden in Abbildung 3-10 zusätzlich die Konfidenzintervalle der Steigungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=5\%$ und ein dreistufiges Polynom eingezeichnet. Alle weiteren Versuche wurden mit einem optimierten Abstand von 8 mm durchgeführt.

3.6 Vergleich unterschiedlicher Techniken zur Temperaturmessung

Für die Temperaturmessung in der Kapillarelektrophorese wurden seit dem Aufkommen von CE-Systemen verschiedene Techniken entwickelt. In Kapitel 2.2.3 sind diese bereits kurz erwähnt worden. Die Daten des Infrarotthermometers sollten mit drei Temperaturen verglichen werden, die indirekt aus dem elektrischen Leitwert [69], der Stromstärke und der elektroosmotischen Geschwindigkeit [58] berechnet werden. Daneben gibt es noch einige weitere Methoden, die z.B. wie in den Referenzen [66–68] beschrieben die temperaturabhängige Fluoreszenz von Rhodamine B nutzen. Die Messung von Temperaturen mit thermochromen Lösungen aus Referenz [113] zeigt sich im Licht der

Ergebnisse des IR-Thermometers systematisch zu niedrig. Für Mikrochips hat sich bereits der Einsatz von Infrarotkameras bewährt [114, 115].

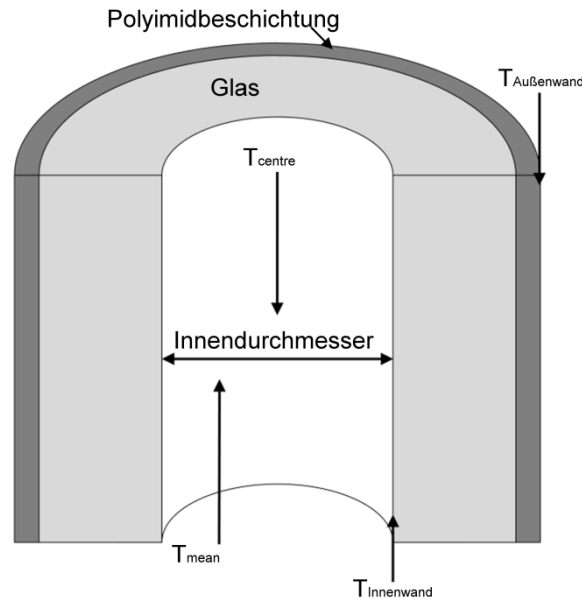


Abbildung 3-11: Verschiedene Punkte in einer Kapillare, an denen die Temperatur gemessen werden kann

Wichtig zu beachten beim Vergleich der Techniken ist die Definition der Temperatur, die bestimmt wird. So wird bei Berechnung der Temperatur über den elektrischen Leitwert nach Referenz [69] die mittlere Temperatur (T_{mean} in Abbildung 3-11) im Inneren der Kapillare berechnet. Knox et al. definieren ihre Temperatur, die über die Stromstärke bzw. die elektroosmotische Geschwindigkeit berechnet wird, als diejenige, die genau im Zentrum der Kapillare herrscht (T_{centre}) [58].

Mit dem IR-Thermometer wird die Temperatur an der Außenwand gemessen. Diese kann mit Gleichung 27 in die korrespondierende Temperatur im Inneren der Kapillare umgerechnet werden, da die Wärmeleitfähigkeiten der einzelnen Schichten (Polyimid, Glas, Elektrolyt) und die Schichtdicken bekannt sind [69].

$$T_{\text{mean}} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{4\pi\lambda_{\text{Elektrolyt}}} * \frac{P}{L} \right) + \left(\frac{1}{2\pi\lambda_{\text{Wand}}} * \ln\left(\frac{od}{id}\right) * \frac{P}{L} \right) + T_{\text{Außenwand}}$$

T_{mean} mittlere Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]

λ Wärmeleitfähigkeit [$\text{W} * \text{K}^{-1} * \text{m}^{-1}$]

$T_{\text{Außenwand}}$ Temperatur, gemessen an der Außenwand einer Kapillare [$^{\circ}\text{C}$]

Gleichung 27: Berechnung der mittleren Temperatur T_{mean} in der Kapillare aus der IR-Temperaturmessung

Literaturwerte für die Konstanten sind die Wärmeleitfähigkeit des Elektrolyten von $0,605 \text{ W}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$, des Glases von $1,40 \text{ W}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ und der Polyimidbeschichtung von $0,155 \text{ W}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ [69]. Bis auf die praktischen Arbeiten zu Kapitel 3.4 wurden nur Kapillaren mit einem Außendurchmesser (od) von $375 \mu\text{m}$ und einem Innendurchmesser (id) von $50 \mu\text{m}$ genutzt. Für die Wärmeleitfähigkeit λ_{wand} werden die zwei Werte des Glases und der Polyimidbeschichtung mit ihren Schichtdicken zu einem Wert zusammengefasst. In Gleichung 27 berechnet die erste Klammer den Wärmeübergang im Elektrolyten, die zweite Klammer den Wärmeübergang in der Kapillarwand.

Abbildung 2-7 zeigt, dass selbst an unterschiedlichen Punkten innerhalb der Kapillare unterschiedliche Temperaturen herrschen und ein radiales Temperaturprofil in der Kapillare entsteht. Deswegen kann im Vergleich erwartet werden, dass es Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Techniken geben wird.

3.6.1 Bestimmung der Temperatur aus dem elektrischen Leitwert

Der elektrische Leitwert G mit der Einheit Siemens [S] ist der reziproke Wert des Widerstandes eines elektrischen Leiters [116] und kann ebenfalls aus Spannung und Stromstärke berechnet werden.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U}$$

G elektrischer Leitwert [S]

Gleichung 28: Elektrischer Leitwert G

$$\frac{P}{L} = \frac{U^2 * G}{L} = \frac{\pi * \kappa * id^2 * U^2}{4L^2}$$

κ Leitfähigkeit [$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$]

Gleichung 29: Zusammenhang zwischen der Leistung pro Länge und dem elektrischen Leitwert

Über Gleichung 29 ist der Leitwert mit der Leistung pro Länge verknüpft, wobei κ die elektrische Leitfähigkeit des Elektrolyten und id den Innendurchmesser der Kapillare bezeichnet. Der Temperaturanstieg eines Elektrolyten durch eine bestimmte Leistung pro Länge in der Kapillare ist von seiner elektrischen Leitfähigkeit abhängig. Der thermische Koeffizient der Leitfähigkeit γ zeigt an, wie stark dieser Anstieg ist (siehe Gleichung 30). Dieser kann mithilfe einer Leitfähigkeitszelle gemessen werden. Isono hat in Referenz [117] belegt, dass der thermische Koeffizient unabhängig von der Stöchiometrie des Elektrolyten ist und ein Näherungswert von $\gamma=2\%$ pro $^\circ\text{C}$ bis zu einer Konzentration von $0,1 \text{ mol/l}$ angenommen werden kann.

$$\gamma = \frac{1}{\kappa} * \frac{d\kappa}{dT}$$

γ *thermischer Koeffizient der elektrischen Leitfähigkeit*

Gleichung 30: Thermischer Koeffizient der elektrischen Leitfähigkeit γ

Die mittlere Temperaturdifferenz zwischen eingestellter Temperatur und dem Inneren der Kapillare lässt sich dann nach Referenz [69] mit Gleichung 31 berechnen.

$$\Delta T_{mean} = \frac{G_T - G_0}{\gamma G_0}$$

G_T *elektrischer Leitwert für die zu berechnende Temperatur [S]*

G_0 *elektrischer Leitwert ohne zusätzliche Wärmeeffekte [S]*

Gleichung 31: Berechnung der mittleren Temperaturdifferenz ΔT_{mean} in der Kapillare

In Gleichung 31 müssen neben dem thermischen Koeffizienten der elektrischen Leitfähigkeit γ , zwei elektrische Leitwerte eingesetzt werden. G_T ist der elektrische Leitwert, für den eine Temperatur berechnet werden soll. Der elektrische Leitwert G_0 beschreibt den Zustand ohne zusätzliche Wärmeeffekte, die immer auftreten, wenn eine Spannung angelegt wird. Um diesen Wert zu erhalten, werden die Leitwerte einer Serie gegen die applizierte Leistung pro Länge aufgetragen und eine lineare Regression berechnet. Der y-Achsenabschnitt beschreibt dann den elektrischen Leitwert G_0 .

Gleichung 31 kann mit weiteren Gleichungen aus Referenz [69] zu Gleichung 32 zusammengefasst werden, so dass mit der im CE-System eingestellten Temperatur T_{set} direkt die Temperatur in der Kapillare berechnet werden kann.

$$T_{mean} = T_{set} + \frac{\left(\frac{G_T}{G_0} - 1 \right)}{0,02}$$

T_{set} *eingestellte Temperatur [°C]*

Gleichung 32: Berechnung der mittleren Temperatur T_{mean} in der Kapillare

3.6.2 Berechnung der Temperatur aus dem Anstieg der Stromstärke

Stromstärke und die elektroosmotische Geschwindigkeit werden durch die Viskosität des Elektrolyten beeinflusst. Die Viskosität wiederum ist abhängig von der Temperatur. Über diesen Zwischenschritt, der Berechnung der Viskosität, kann aus der Stromstärke bzw. der elektroosmotischen Geschwindigkeit die Temperatur berechnet werden. Gleichung 33 ist ein Beispiel für den Zusammenhang zwischen Strom und Viskosität, auch der Zusammenhang zwischen Viskosität und elektroosmotischer Geschwindigkeit ist zu sehen. Diese ist aus zwei

elementaren Gleichungen zur elektroosmotischen Geschwindigkeit und dem Ohmschen Gesetz zusammengesetzt [58]. Für die nachfolgende Berechnung der Temperatur aus der elektroosmotischen Geschwindigkeit zeigt Gleichung 33 ebenfalls die Zusammenhänge (Kapitel 3.6.3). Die Voraussetzungen und alle weiteren Variablen der Gleichung werden für beide Berechnungsweisen hier diskutiert.

$$I = \kappa * \eta \frac{\pi r^2}{\varepsilon_0 * \varepsilon_r * \zeta} v_{EOF}$$

Gleichung 33: Zusammenhang zwischen Stromstärke und elektroosmotische Geschwindigkeit

Neben der Viskosität η , der Stromstärke I und der elektroosmotischen Geschwindigkeit v_{EOF} gehen noch die Permittivität des Vakuums ε_0 mit $8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m, die relative Permittivität ε_r , das Zetapotential ζ , die Leitfähigkeit des Elektrolyten κ und der Innenradius der Kapillare r in die Gleichung mit ein. Nach Referenz [58] wird der Term $\varepsilon_r \zeta$ als konstant angesehen, da die elektroosmotische Geschwindigkeit v_{EOF} und die Stromstärke I linear zueinander sind. Mit dieser Voraussetzung ist die Viskosität nur von der Stromstärke und der elektroosmotischen Geschwindigkeit abhängig. Über beide Parameter kann die Viskosität bestimmt und aus dieser die Temperatur z.B. mit anderem Gleichung 14 (Kapitel 2.2.3) berechnet werden. Da die Andrade-Gleichung (Gleichung 14) eine Abweichung von 2% im benötigten Temperaturintervall im Vergleich zu experimentellen Daten zeigt, wurde für die Temperaturbestimmung nach Referenz [58] eine Gleichung genutzt, die aus Literaturdaten über die Viskosität von Wasser berechnet wurde. Gleichung 34 weist nur eine Abweichung von 1% in dem Temperaturbereich von 20-100°C auf [58].

$$T = -251\eta^3 + 624\eta^2 - 570\eta + 215$$

Gleichung 34: Berechnung der Temperatur aus der Viskosität für den Bereich 20-100°C

Ein Teil von Gleichung 33 beruht auf der Erweiterung des Ohmschen Gesetz für Lösungen, die in Gleichung 35 noch einmal alleine dargestellt ist [110].

$$I = \pi r^2 * \kappa * E$$

Gleichung 35: Bestimmung der Stromstärke für Lösungen in Kapillaren

Die Viskosität kann über eine Umformung von Gleichung 35 berechnet werden. Die Leitfähigkeit des Puffers ist direkt proportional zu dem reziproken Wert der Viskosität. Wird diese Annahme in Gleichung 35 eingesetzt und umgeformt, so entsteht folgender Zusammenhang, in dem die Permittivitätswerte und das Zetapotential als Konstante C eingehen.

$$\frac{I}{E} = \frac{\pi r^2 C}{\eta}$$

C Konstante, bestehend aus $\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta$

Gleichung 36: Zusammenhang zwischen Stromstärke und dynamische Viskosität

Zur Berechnung der Temperatur muss eine Serie von Läufen durchgeführt werden, bei der unterschiedliche Spannungen und damit auch unterschiedliche Feldstärken angelegt werden. Der Term I/E wird dann gegen die Feldstärke aufgetragen und eine Regression berechnet (siehe Abbildung 3-12). Der y-Achsenabschnitt entspricht dann dem Term $\pi r^2 C / \eta$. Mithilfe der Viskosität von Wasser bei Zimmertemperatur werden die Konstanten aus Gleichung 36 berechnet. Im nächsten Schritt kann für jedes weitere Paar I/E die Viskosität ermittelt werden. Über Gleichung 34 wird dann die Temperatur berechnet.

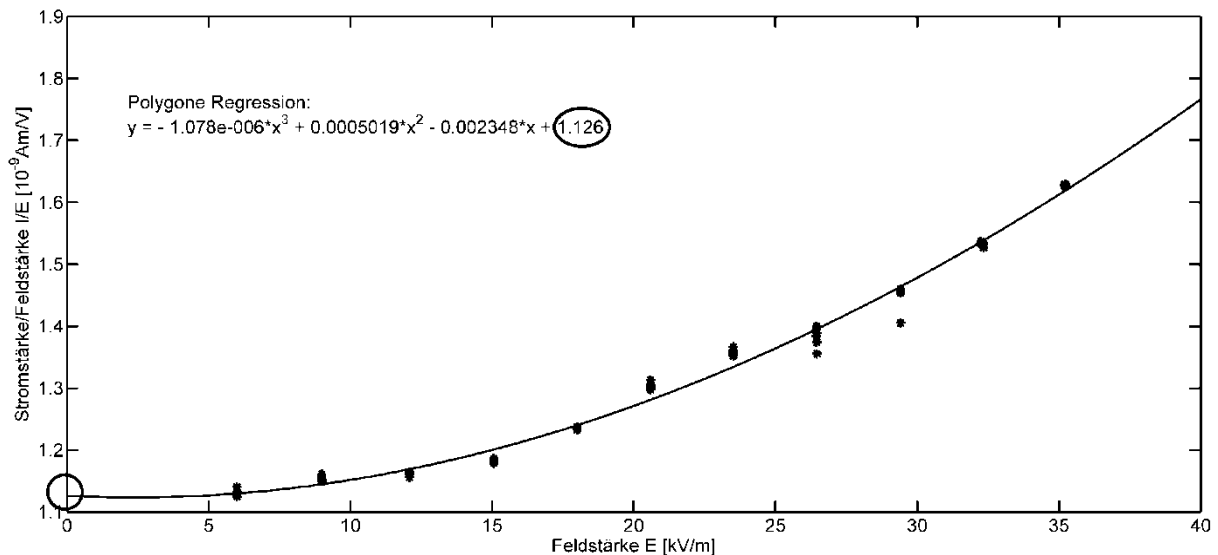


Abbildung 3-12: Diagramm der Feldstärke gegen den Quotienten aus Stromstärke und Feldstärke mit Regression zur Bestimmung des y-Achsenabschnitts nach Referenz [58]

3.6.3 Berechnung der Temperatur aus der elektroosmotischen Geschwindigkeit

Für die Berechnung der Temperatur aus der elektroosmotischen Geschwindigkeit werden zusätzlich Informationen über den elektroosmotischen Fluss benötigt. Aus Elektropherogrammen mit Acetanilid als EOF-Marker kann die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses über die effektive Länge der Kapillare und der Migrationszeit des Markers berechnet werden. Bei geringer applizierter Leistung ist der EOF sehr langsam und der Peak des Acetanilids taucht erst spät im Elektropherogramm auf. Deswegen wurden nur Elektropherogramme genutzt, in denen der Acetanilid-Peak spätestens nach 60 min zu sehen ist. Weiterhin werden gleichzeitig die Spannung, die Stromstärke und die Kapillaraußentemperatur aufgenommen.

Der zweite Teil der Gleichung 33, der die elektroosmotische Geschwindigkeit beschreibt, ist in Gleichung 37 dargestellt und bereits so umgeformt, dass wie in Kapitel 3.6.2 die Viskosität berechnet werden kann [58].

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta E}{\eta} \Rightarrow \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta}$$

Gleichung 37: Zusammenhang zwischen elektroosmotischer Geschwindigkeit und dynamischer Viskosität

Für die Berechnung der Viskosität wird angenommen, dass der Term $\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta$ konstant ist [58]. Der Term v_{EOF}/E wird gegen die Feldstärke aufgetragen und eine Regression berechnet. Der y-Achsenabschnitt ist dann gleich dem letzten Quotienten in Gleichung 37. Der konstante Teil der Gleichung kann wiederum, wie bereits in Kapitel 3.6.2 beschrieben, über die Viskosität von Wasser bei Zimmertemperatur berechnet werden. Für jedes Paar v_{EOF}/E wird über Gleichung 37 eine Viskosität berechnet, die dann in Gleichung 34 eingesetzt die entsprechende Temperatur liefert.

3.6.4 Das Ergebnis des Vergleiches

Eine Serie von Trennungen in einem Phosphatpuffer (0,05 mol/l, pH 8) und verschiedenen Spannungen wurde auf der PrinCE 550 CE bei einer eingestellten Temperatur von 23°C durchgeführt, Acetanilid diente als EOF-Marker. Neben den Elektropherogrammen wurde ebenfalls die Temperatur an der Außenwand der Kapillare mithilfe des IR-Thermometers gemessen, sowie Spannung und Stromstärke aufgezeichnet. Der Vergleich wurde ebenfalls mit der Agilent 1600 CE durchgeführt. Allerdings wurden ein anderer Phosphatpuffer (0,10 mol/l, pH 7) und eine kürzere Kapillare – 50 statt 85 cm – genutzt. Weitere Informationen zu der verwendeten Methode sind in Kapitel 8.3 zu finden.

Temperaturen wurden für alle vorgestellten Methoden (Kapitel 3.6.1 bis 3.6.3) berechnet, sowie die Temperatur der Außenwand, gemessen mit dem IR-Thermometer, in die korrespondierende mittlere Temperatur in der Kapillare umgerechnet (siehe Gleichung 27). Alle Temperaturwerte sind in Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14 gegen die Leistung pro Länge aufgetragen.

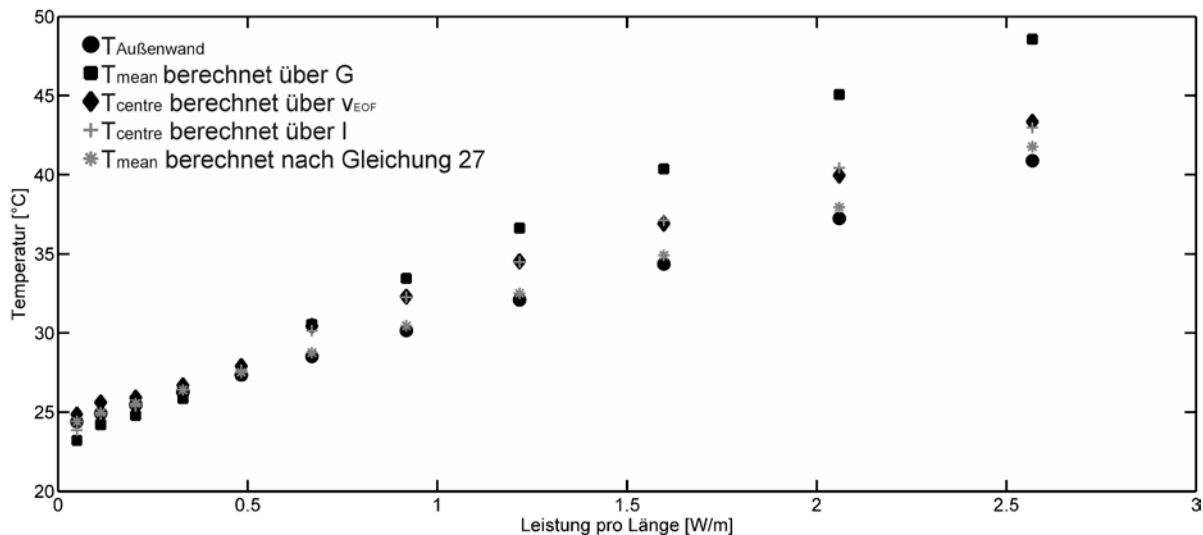


Abbildung 3-13: Vergleich der unterschiedlichen Techniken zur Temperaturbestimmung in der Kapillare an der PrinCE 550 CE

Vergleicht man Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14 miteinander, so ist bereits deutlich der Unterschied in den verschiedenen Kühlsystemen zu sehen. Diese Thematik wird näher in Kapitel 3.7 behandelt. Auf die Unterschiede im Aufbau der Geräte und Einbau einer Kapillare wird nachfolgend eingegangen. Zu beachten ist die deutlich höhere Leistung und die daraus deutlich höheren Temperaturen bei der Untersuchung mit der Agilent 1600 CE, die durch den Einbau einer kürzeren Kapillare erreicht werden konnte. Alle gemessenen und berechneten Temperaturen zeigen die gleiche Tendenz. Die Differenz zwischen den einzelnen Methoden kann bis zu 8°C betragen, wenn mehr als 2,5 W/m angelegt werden (PrinCE). Die Untersuchung an der Agilent 1600 CE ergab eine um bis zu 18°C höhere Temperatur bei einer Leistung pro Länge von 12 W/m zwischen der Messung des IR-Thermometers und der Berechnung über die Stromstärke. Aber selbst in der Publikation von Knox und McCormack werden Differenzen zwischen den Methoden von bis zu 8,5°C präsentiert. Der Unterschied zwischen „T_{Außenwand}“ und „T_{mean} berechnet nach Gleichung 27“ ist in Abbildung 3-13 kaum zu sehen, da der Verlust der Wärme durch den Elektrolyten und die Kapillarwand sehr gering ist. Erst bei einer sehr großen Leistung pro Länge von 12 W/m ist der Unterschied gut in Abbildung 3-14 zu erkennen. Der größte Teil der Jouleschen Wärme wird an die Außenseite der Kapillare transportiert und kann dort bestimmt werden.

Für die Differenz zwischen gemessener und rechnerisch bestimmten Temperaturen gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Zum Einen zeigt die Abstandsoptimierung zwischen Kapillare und IR-Thermometer in Kapitel 3.5 deutlich die Abhängigkeit der Temperatur vom Abstand. Die optimale Distanz steht in Bezug zu der optischen Auflösung des IR-Thermometers, selbst nach der Optimierung fokussiert das Thermometer nicht vollständig auf die Kapillare. Wenn ein Thermometer mit einer besseren Fokussierung erhältlich wäre

und die Kapillare den Fokus dann auch vollständig ausfüllt, kann man davon ausgehen, dass die Temperaturen etwas höher ausfallen würden.

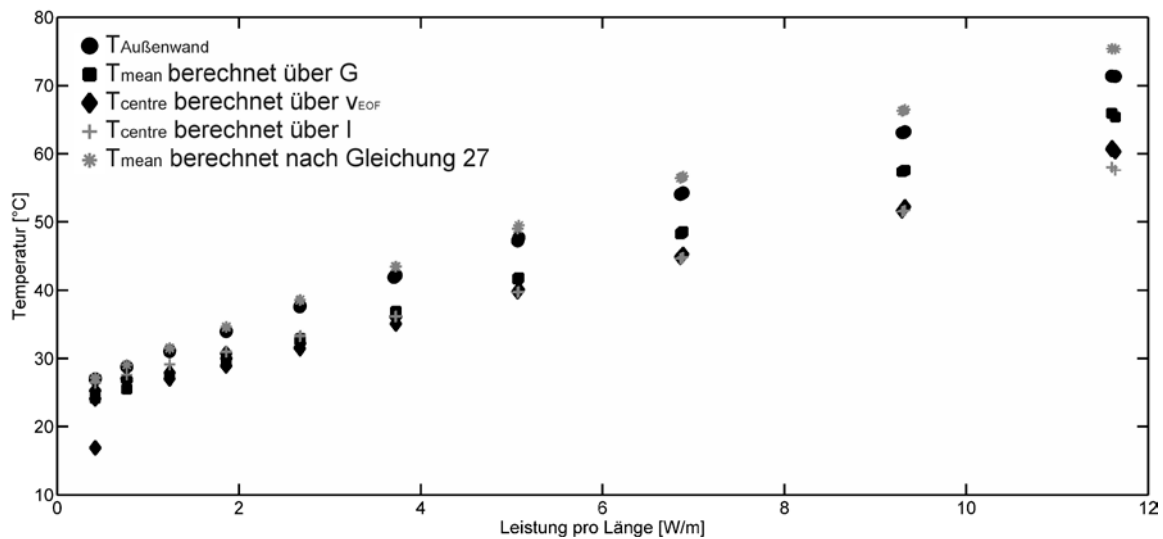


Abbildung 3-14: Vergleich der unterschiedlichen Techniken zur Temperaturbestimmung in der Kapillare an der Agilent 1600 CE

Zum Anderen werden für die Berechnungen der Temperaturen Konstanten benötigt, bzw. Variablen als konstant angesehen. Zum Beispiel wird für die Berechnungen nach Referenz [110] (Kapitel 3.6.2 und 3.6.3) angenommen, dass das Produkt aus Zetapotential ζ und der relativen Permittivität ϵ_r konstant und temperaturunabhängig ist. Mittlerweile weiß man, dass dem nicht so ist, sondern es zu einer leichten Abnahme des Produktes von 0,07% pro °C kommt [118]. Dies kann eine Erklärung für die Unterschiede bei höheren Temperaturen sein, insbesondere für die Bestimmung nach Knox et al. (siehe [110] und Kapitel 3.6.2 und 3.6.3). Mit den Erkenntnissen aus Referenz [118] verbesserte Evenhuis et al. die Bestimmung der Temperatur und entwickelte die Berechnung über den elektrischen Leitwert (siehe [69] und Kapitel 3.6.1).

Desweiteren werden in allen Berechnungen Konstanten genutzt, wie z.B. die thermische Leitfähigkeit des Elektrolyten. Wenn beispielsweise die Zusammensetzung des Puffers wechselt, so müssen alle damit zusammenhängenden Konstanten auf ihre Eignung und Anwendbarkeit überprüft werden. Außerdem ist es ein Unterschied, ob die Wärme mit einem strömenden Medium, wie Luft oder Flüssigkeit, oder nur mit passiver Konvektion von der Oberfläche entfernt wird [106]. Der Transport der Wärme wird aber in keiner der Berechnungsmethoden berücksichtigt. Im Gegenzug ist die eingestellte Temperatur des Kühlungssystems ebenfalls eine der genutzten Konstanten, die von den Methoden nicht weiter überprüft wird (siehe Kapitel 3.7).

Der bei weitem wohl größte Unterschied zwischen den Methoden ist, dass die Berechnungen einen Mittelwert der Temperatur über die gesamte Länge der Kapillare darstellen, wohingegen das IR-Thermometer nur einen kleinen Ausschnitt wiedergibt. Besonders der in Kapitel 2.2.3 (Seite 20) vorgestellte Temperaturgradient in Längsrichtung wird sich in den Ergebnissen bemerkbar machen. In der PrinCE 550 CE sind z.B. nur 21% der Kapillare im thermostatierten Ofenraum. Weitere 26% befinden sich außerhalb des Systems, um in den Detektor geführt zu werden. Hier wird die Wärme über passive Konvektion abgeführt. Alle weiteren Bereiche der Kapillare sind in Vials, Detektor oder Verbindungsstücken. In diesen ist selbst die passive Konvektion eingeschränkt, da die Kapillare teilweise eng von Kunststoffteilen eingepackt ist. Eine Testserie mit ausgeschalteter Kühlung ergab mit dem IR-Thermometer z.B. bei 2,5 W/m eine gemessene Temperatur, die um 10°C höher lag, als mit Kühlung.

In der Agilent 1600 CE sind die Kapillaren in Kassetten verstaut, die mit Luft durchströmt werden. Immer 18,5 cm der Kapillare sind in den ungekühlten Bereichen – Inlet, Outlet und Detektorfenster – eingebaut, unabhängig von der Gesamtlänge, die variabel gewählt werden kann. In dem hier vorgestellten Beispiel ist die Kapillare 50 cm lang, somit sind 63% der Kapillare gut gekühlt, 37% nicht.

Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14 zeigen, dass die Messung der Temperatur mit einem IR-Thermometer vom CE-System abhängt. Die Temperaturen, welche in der PrinCE 550 CE gemessen wurden, waren durchweg niedriger als die berechneten Werte. Im Gegensatz dazu waren die gemessenen Werte in der Agilent 1600 CE wesentlich höher als die berechneten. Im Vergleich der Bereiche mit oder ohne Kühlung der beiden CE-Systeme lässt sich erklären, warum die mit Infrarot gemessenen Temperaturen eine unterschiedliche Lage zu den berechneten Werten haben. Da die berechneten Werte immer einen Durchschnitt der Temperatur über die gesamte Kapillare anzeigen, sind hier sowohl Temperaturen aus gekühlten als auch aus nicht gekühlten Bereichen abhängig von der Länge der Bereiche eingegangen. In der PrinCE 550 CE werden gerade einmal 21% der Kapillare gekühlt, in der Agilent 1600 CE sind es über 60%. Aufgrund des Einbaus des IR-Thermometers ist es nicht möglich die Temperatur unter gekühlten Bedingungen zu messen. Auch der Bereich innerhalb des Aufsatzes ist nicht gekühlt, allerdings ist dieser Bereich nur sehr kurz und fällt weniger ins Gewicht als zum Beispiel Inlet oder Detektorfenster der PrinCE 550 CE. Die Lage der Funktionen, also die berechneten und die mit IR-Thermometer gemessenen, zueinander ist nun abhängig, ob mehr als 50% gekühlt werden, denn dann dominieren bei den berechneten Temperaturen die gekühlten Bereiche und sind somit niedriger als im Aufsatz des IR-Thermometers. Andersherum, wie das Beispiel PrinCE 550 CE zeigt,

dominieren dort die nicht-gekühlten Bereiche, an denen teilweise noch nicht einmal passive Konvektion stattfinden kann. Die gemessene Temperatur ist somit niedriger als der Temperaturdurchschnitt über die komplette Kapillare.

In den aktuellen Publikationen von Evenhuis et al. [70, 119–121] wird versucht, zwei Temperaturen T_{ef} für den gekühlten und T_{inef} für den nicht-gekühlten Bereich zu berechnen. Dafür müssen gerätespezifische, physikalische Parameter, wie z.B. der Koeffizient des Wärmetransports erhoben werden. In einem iterativen Algorithmus nähert man sich danach den wahren Temperaturen an und nutzt wieder die Temperaturabhängigkeit des elektrischen Leitwertes. Die Rechnungen für diese Bestimmung sind im Vergleich zu den beschriebenen Bestimmungen wesentlich aufwendiger und benötigen teilweise spezielle Kurvenregressionen des Programms Origin®. Der Berechnungsalgorithmus ist dadurch nicht vollständig transparent.

Mit der Messung des IR-Thermometers und mit der Vereinfachung, die noch in den nächsten zwei Kapiteln behandelt wird, kann man bedeutend schneller Temperaturen aus der Leistung ableiten. Obwohl die Temperatur von vielen verschiedenen Parametern beeinflusst werden kann, können mit Hilfe des IR-Thermometers die Unterschiede in den Kühlsystemen bzw. ob die Kühlung angeschaltet ist oder nicht, erkannt werden.

3.7 Vergleich von verschiedenen Kühlungssystemen

In kommerziell erhältlichen CE-Geräten werden verschiedene Systeme zur Temperaturregung und Kühlung der Kapillare eingesetzt. Unter anderem werden Systeme eingebaut, die mithilfe eines Ventilators kühlen bzw. einen Luft- oder Flüssigkeitsstrom mit hoher Geschwindigkeit an der Kapillare entlang leiten. Wie bereits in Kapitel 3.6.4 erwähnt, werden nicht alle Bereiche der Kapillare gekühlt, an nicht-gekühlten Bereichen wird die Wärme über passive Konvektion abgeführt [106].

Eine effektive Thermostatisierung der Kapillare ist ein wichtiger Aspekt für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Parameter für die Effizienz sind die Wärmekapazität und die Geschwindigkeit des umgebenden Mediums [106]. Wenn der Wärmeabtransport von der Kapillare nicht adäquat ist, so steigt die Temperatur. Mit steigender Temperatur sinkt der Widerstand bzw. die Leitfähigkeit steigt und damit steigt auch der Strom wiederum an. In Abbildung 3-7 ist dieser Effekt zu sehen, Strom und Temperatur steigen kontinuierlich an, obwohl die Spannung konstant ist. Dies wiederholt sich, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist und wird auch als autothermaler Effekt bezeichnet [69]. Das Gleichgewicht aus

Produktion und Abtransport der Wärme ist unter anderem abhängig von der Effizienz des Kühlungssystems. Wenn die Thermostatisierung nicht ausreichend ist, so kann der autothermale Effekt zum Kochen bzw. Überhitzen des Elektrolyten führen [119]. Abbildung 3-2 zeigt, welchen Effekt ein kochender Elektrolyt hat. Die Trennung bricht durch die Bildung von Luftblasen ab. Pufferbestandteile kristallisieren währenddessen an der Kapillarinnenoberfläche aus und die Kapillare ist danach meist nicht weiter nutzbar.

Zur Charakterisierung von Kühlungssystemen kann die in Kapitel 3.3 eingeführte Datenauswertung noch erweitert werden. Bis jetzt wurde für jede Serie eine lineare Regression nach Gleichung 38 berechnet. T_0 ist die Temperatur an der Kapillare, die ohne Anlegen von Spannung herrscht, und α ist die Steigung, der sogenannte „temperature rise factor“ (Faktor des Temperaturanstiegs) [106].

$$T = T_0 + \alpha \frac{P}{L}$$

T_0 Temperatur ohne Anlegen einer Spannung [$^{\circ}\text{C}$]

α Faktor des Temperaturanstiegs

Gleichung 38: Lineare Funktion für den Zusammenhang von Leistung pro Länge und Temperatur

Die Temperatur T_0 kann zusätzlich auch als Summe aus der eingestellten Temperatur T_{set} und dem systematischen Fehler der Temperaturkontrolle δT ausgedrückt werden. Aus Gleichung 38 ergibt sich dann Gleichung 39. δT ist ein Maß für die lückenhafte Thermostatisierung der Kapillare. Die Variable α charakterisiert die Fähigkeit des Systems Wärme von der Kapillare zu entfernen. Im optimalen Fall tendieren beide Werte gegen null. Zu beachten ist aber, dass δT von T_{set} abhängig ist [106].

$$T = T_{\text{set}} + \delta T + \alpha \frac{P}{L}$$

δT systematischer Fehler der Temperaturkontrolle [$^{\circ}\text{C}$]

Gleichung 39: Lineare Funktion für den Zusammenhang von Leistung pro Länge und Temperatur mit zusätzlicher Berechnung des systematischen Fehlers der Temperaturkontrolle

In Abbildung 3-15 sind sowohl für die PrinCE 550 CE, als auch für die Agilent 1600 CE die Temperaturen gegen die Leistung pro Länge aufgetragen, jeweils einmal mit und einmal ohne Kühlung. Die PrinCE 550 CE kühlt mit einem Ventilator, der $1,2 \text{ m}^3/\text{min}$ Luft bewegt. Der Luftstrom der Agilent 1600 CE wird mit einer Geschwindigkeit von 10 m/s an der Kapillare entlang geleitet. Ohne Kühlung bedeutet in diesem Fall, dass nicht nur über die Software der jeweiligen CE die Thermostatisierung ausgeschaltet wurde, sondern auch mithilfe von fester Pappe die Luftzufuhr abgedichtet wurde. Ein Ausschalten allein bewirkte nur, dass der Luftstrom keiner Temperaturkontrolle mehr unterlag, aber noch vorhanden war.

Erst durch den Stopp des Luftstroms Richtung Kapillare war gewährleistet, dass kein aktiver Wärmetransport mehr stattfand, sondern die Wärme über passive Konvektion an die Umgebung abgegeben wurde. Alle 4 Serien wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben ausgewertet, die dazugehörigen Funktionen der linearen Regression sind in Abbildung 3-15 eingefügt.

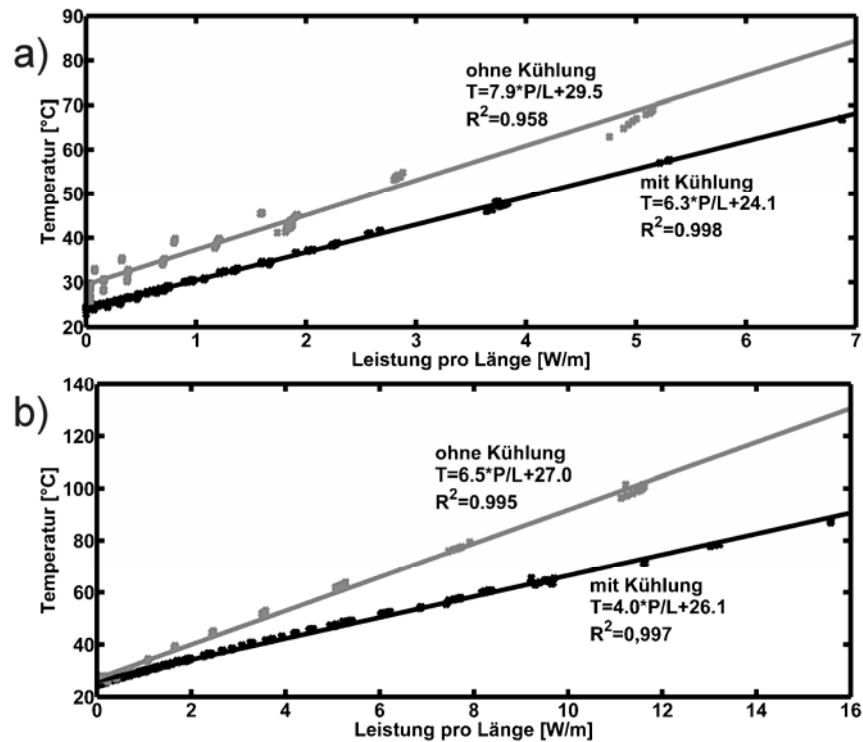


Abbildung 3-15: Diagramme zur linearen Beziehung zwischen Leistung pro Länge und der Temperatur unter verschiedenen Kühlungsbedingungen; a) PrinCE 550 CE mit einem Ventilator; b) Agilent 1600 CE mit einem forcierten Luftstrom als Kühlung

Die Funktionen mit Kühlung wurden für den Vergleich der Kühlungssysteme nach Gleichung 39 umgeformt und in Tabelle 3-3 eingetragen. In beiden Serien war die Temperatur des Kühlungssystems auf 23°C (T_{set}) eingestellt.

Tabelle 3-3: Auswertung der Funktionen aus Abbildung 3-15 nach Gleichung 39

Serie	Funktion
PrinCE 550 CE mit Kühlung	$T = 23^\circ\text{C} + 1,1^\circ\text{C} + 6,3 \frac{P}{L}$
Agilent 1600 CE mit Kühlung	$T = 23^\circ\text{C} + 3,1^\circ\text{C} + 4,0 \frac{P}{L}$

Die Funktionen zeigen deutlich, dass die Kühlung mit einem Ventilator nicht so effektiv ist wie mit einem Luftstrom, der mit hoher Geschwindigkeit durch das System geleitet wird. Zu beachten ist bei diesem Vergleich weiterhin, dass nur 21% der Kapillare in der PrinCE 550 CE überhaupt gekühlt werden. Die Werte für δT , dem systematischen Fehler der

Temperaturkontrolle, sind dessen ungeachtet besser für die PrinCE 550 CE. In Abbildung 3-15 lässt sich desweiteren erkennen, dass die berechneten Temperaturwerte für eine Leistung pro Länge größer als 10 W/m von der Funktion der linearen Regression alle überschätzt werden. In diesem Bereich kann man nicht mehr von einem linearen Zusammenhang sprechen. Berechnet man eine lineare Regression nur mit Wertpaaren, deren Leistung pro Länge kleiner als 10 W/m ist, so ergibt sich ein kleinerer Wert für δT (2,8°C), im Gegenzug erhöht sich andererseits die Steigung α auf 4,18. Die Werte für α zeigen, dass die Kühlung des Agilent-System dem Ventilator der PrinCE 550 CE überlegen ist. Aber die Temperaturreglung des Luftstromes ist in der Agilent noch nicht ausgereift, da der δT -Wert größer ist als für die PrinCE 550 CE. Untersuchungen mit berechneten Temperaturen zeigen ähnliche Ergebnisse für die Bewertung der Kühlungssysteme. So ist die Kühlung mit einem forcierten Luftstrom der Kühlung mit einem Ventilator und der passiven Konvektion überlegen [109, 122]. In der Untersuchung von Veraart et al. wird die Kühlung mit forciertem Luftstrom gleichwertig zur Kühlung mit Flüssigkeitsstrom bewertet [122].

Ohne Kühlung ist die Steigung wie erwartet erhöht. Die Unterschiede zwischen den zwei Geräten können durch deren Aufbau erklärt werden. In der PrinCE 550 CE sind wesentlich größere Abschnitte der Kapillare eng von Bauteilen umgeben, dass selbst die passive Konvektion eingeschränkt ist. Die Kapillare heizt sich dementsprechend wesentlich schneller auf, wenn keine Kühlung vorhanden ist. Zum Beispiel ist die Temperatur ohne Kühlung in der PrinCE 550 CE fast um 10°C höher bei 2,5 W/m als mit Kühlung. Da die Kühlung ein sehr wichtiger Bestandteil für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist, wurde aus den Daten dieses Kapitels ein Funktionstest erarbeitet, der im nächsten Kapitel vorgestellt wird.

3.8 Allgemeiner Test zur Überprüfung des Kühlungssystems von CE-Geräten

Als wichtiger Bestandteil für reproduzierbare Ergebnisse ist die Temperatur ein Parameter, der während einer Qualifizierung überprüft werden sollte (siehe Kapitel 4). Ein eingebautes Thermometer wie das hier vorgestellte IR-Thermometer würde einen Test stark vereinfachen. Während der Analysen können Daten erhoben werden, die einen vorher bestimmten Grenzwert nicht überschreiten dürfen. Da aber nicht jedermann ein IR-Thermometer in sein CE-Gerät einbauen möchte, bzw. dies bei CE-Geräten mit Flüssigkühlung gar nicht möglich ist, muss für einen allgemein gültigen Test über einen anderen Parameter indirekt eine Aussage zum Status des Kühlsystems getroffen werden. Hierfür eignet sich die Stromstärke, die von aktuellen CE-Geräten gemessen und aufgenommen werden kann. Wie in Abbildung 3-2 gut zu sehen, verhalten sich Temperatur

und Stromstärke gleichsinnig. Dies hat seinen Ursprung im autothermalen Effekt, der in Kapitel 3.7 erklärt wurde.

Für die beiden Systeme von Prince und Agilent wurde ein sogenannter Ohmscher Plot angefertigt, in dem die elektrische Feldstärke gegen die Stromstärke aufgetragen wurde. In Abbildung 3-16 sind jeweils zwei Fälle eingezeichnet. Wie bereits in Kapitel 3.7 beschrieben, wurde auch als Vorbereitung des Funktionstestes für jedes Gerät jeweils eine Serie einmal mit und einmal ohne Kühlung durchgeführt. In der Abbildung 3-16 sind die Unterschiede zwischen Kühlung und ausgeschalteter Kühlung ab einer bestimmten Feldstärke gut zu erkennen.

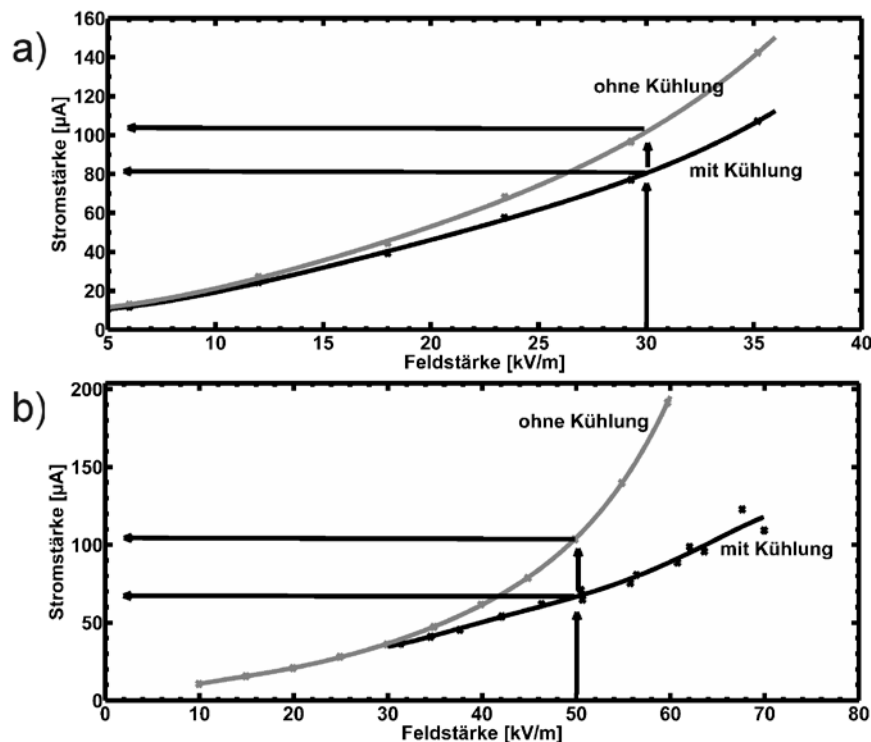


Abbildung 3-16: Ohmscher Plot zwischen angelegter Feldstärke und resultierender Stromstärke unter verschiedenen Kühlungsbedingungen; a) PrinCE 550 CE mit einem Ventilator; b) Agilent 1600 CE mit einem forcierten Luftstrom als Kühlung

Um diesen Unterschied sichtbar zu machen, ist es nötig, Puffer mit einer hohen Ionenstärke und eine hohe Feldstärke einzusetzen. Je länger die Kapillare ist, desto höher konzentriert muss ein Puffer sein, um eine hohe Stromstärke zu erzeugen. In Tabelle 3-4 sind die Puffer aufgeführt, die für die Plots in Abbildung 3-16 genutzt wurden. Sowohl in der Abbildung 3-16 eingezeichnet, als auch in der Tabelle 3-4 eingetragen sind die Grenzwerte für die Stromstärke, bzw. der Leistung pro Länge. Wenn die gemessene Stromstärke bei einem Testlauf mit dem definierten Phosphatpuffer und der definierten Feldstärke z.B. für die PrinCE 550 CE $100 \mu\text{A}$ überschreitet, so arbeitet das Kühlungssystem nicht bzw. nicht einwandfrei.

Mit den Funktionen aus Abbildung 3-15 können zu den Werten aus Tabelle 3-4 korrespondierende Temperaturen berechnet werden. So beträgt der Temperaturunterschied zwischen einer Trennung mit Kühlung und ohne Kühlung bei der PrinCE 550 CE 15°C bzw. bei der Agilent 1600 CE 22°C. Mithilfe eines eingebauten IR-Thermometers könnte man wesentlich kleinere Unterschiede feststellen und schon bei Funktionsstörungen des Kühlsystems einschreiten. Mit dem entwickelten Test lässt sich für alle Geräte das Kühlsystem überprüfen. Auch CE-Geräte, die eine andere Kühlung nutzen, können mit diesem Test untersucht werden. Neben den beiden vorgestellten Systemen ist zurzeit noch die Kühlung mit einem Flüssigkeitsstrom in den Geräten von Beckman Coulter auf dem Markt. Nach Referenz [106] besitzt dieses Kühlsystem ähnliche Kennziffern für die Kühleffizienz (Steigung α), so dass auch diese CE -Geräte mit den Parametern der Agilent 1600 CE überprüft werden kann.

Tabelle 3-4: Testsystem für die Überprüfung des Kühlungssystems

Gerät	Kapillarlänge	Phosphatpuffer (Tabelle 8-3)	Feldstärke	Stromstärke und Leistung pro Länge	
				mit Kühlung	ohne Kühlung
PrinCE 550 CE	>0,6 m	0,10 mol/l, pH 7	30 kV/m	~80 μ A 2,4 W/m	~102 μ A 3,1 W/m
Agilent 1600 CE	<0,6 m	0,05 mol/l, pH 7	50 kV/m	~67 μ A 3,4 W/m	~105 μ A 5,3 W/m

3.9 Fazit

Das IR-Thermometer wurde als präzises Werkzeug zur Temperaturmessung etabliert und in zwei kommerziell erhältlichen CE-Systemen eingebaut. Damit ist eine Messung der Temperatur unabhängig von anderen Parametern möglich und zeigt im Vergleich zu indirekten, von Systemparametern abhängigen Methoden vergleichbare Ergebnisse. In der Laborroutine ist eine dauerhafte Messung der Temperatur zwar nicht notwendig, aber eine konstante Temperatur ist für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen wichtig.

Besonders bei der Optimierung von Methoden kann die Messung der Temperatur die Handhabung von sensiblen Analyten wie z.B. Proteinen und die Einstellung von Zeit und Spannung vereinfachen. In Abbildung 3-17 sind zwei Beispieltrennungen zu sehen, wie sie auch während einer Methodenoptimierung auftreten können. Als Analyten kamen Acetanilid als EOF-Marker, Myoglobin und Ovalbumin zum Einsatz. Die Peakformen der Proteine

änderten sich deutlich unter dem Einfluss einer höheren Spannung und damit einhergehenden, höheren Temperaturen. Mit dieser zusätzlichen Information kann die Optimierung der Methode besser überwacht werden und Fehler gefunden bzw. Probleme gelöst werden.

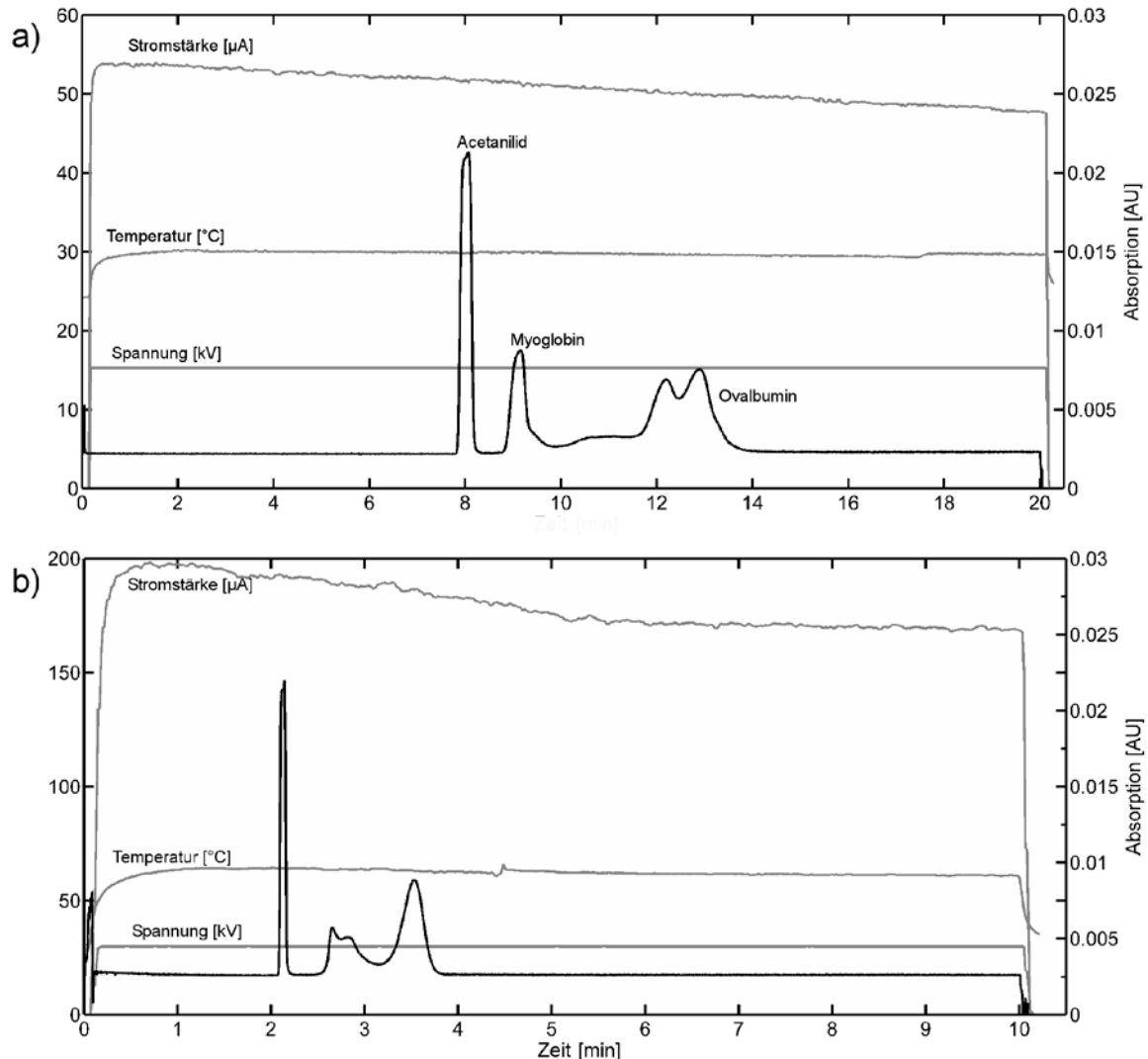


Abbildung 3-17: Beispieltrennung Acetanilid, Myoglobin und Ovalbumin in einem Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 8) auf der PrinCE 550 CE; a) Eine Spannung von 15 kV war angelegt, die in einer Leistung von 0,92 W/m und einer Temperatur von 29,8°C resultierte. b) Eine Spannung von 30 kV war angelegt, die in einer Leistung von 6,31 W/m und einer Temperatur von 62,2°C resultierte. Eine deutliche Veränderung des Trennungsprofils ist zu sehen.

Mit den linearen Zusammenhängen, die in Kapitel 3.7 für die verschiedenen Kühlungssysteme vorgestellt wurden, können Temperaturen aus dokumentierten, elektrischen Parametern abgeschätzt werden. Zu beachten ist hierbei, dass ab einer Leistung pro Länge von größer als 10 W/m ein linearer Zusammenhang nicht mehr gegeben ist und die Temperaturen, die aus den dargestellten Funktionen berechnet werden, die eigentlichen Werte etwas überschätzen.

Für den Einsatz in einem Qualifizierungsprozess ist die direkte Messung der Temperatur nicht mehr nötig, da mit dem vorgestellten Setup aus Tabelle 3-4 ein Kühlsystem anhand der Stromstärke überprüft werden kann. Dieser sehr kurze Funktionstest lässt sich einfach in die Laborroutine einbauen und gibt die Gewissheit, dass das Kühlsystem einwandfrei arbeitet und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht abhängig von der Temperatur sind.

4 Qualifizierung analytischer Instrumente – Ein Konzept für die Kapillarelektrophorese

In den letzten 30 Jahren hat sich die Kapillarelektrophorese in ihrer modernen Form entwickelt und etablierte sich mit ausgereiften Konzepten für Methodenentwicklung und Methodvalidierung [20]. Ihre Haupteinsatzgebiete sind chirale Trennungen, Testungen von biotechnologischen Produkten und klinischen Proben, sowie die Analyse von komplexen Mischungen. Die hohen Erwartungen an die Kapillarelektrophorese, die durch die hervorragende Selektivität geweckt wurden, haben sich in dieser Zeit nicht erfüllt. Gerade im Europäischen Arzneibuch, wie Tabelle 2-3 (Kapitel 2.7) zeigt, dominiert die HPLC als Werkzeug für Reinheitsprüfungen und Gehaltbestimmungen.

Ein wichtiger Aspekt für die Einsatzfähigkeit in Arzneibüchern und der pharmazeutischen Industrie ist die Produktion zuverlässiger, analytischer Daten in der Kapillarelektrophorese. Ein Analytiker muss sich auf die Präzision und die Richtigkeit der Ergebnisse seines Gerätes verlassen können [123], sowie die Integrität der Daten und die Sicherheit der Ergebnisse dokumentieren. Deswegen fordern die Regulierungsbehörden, wie z.B. die Europäische Arzneimittelagentur (EMA, Engl.: European Medicines Agency), das Europäische Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln (EDQM, Engl.: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare) und die Federal Drug Administration (FDA), den Einsatz von Qualitätsmanagementsystemen nach der Guten Laborpraxis (GLP, Engl.: Good Laboratory Practice) und der Normen ISO 9000 und ISO Guide 25 [124]. Diese Richtlinien sind jedoch sehr weit gefasst und beinhalten keine Details für die Durchführung. Die Anforderung, welche die Regulierungsbehörden an die Geräte selbst stellen, ist der Nachweis der Betriebsfähigkeit [123]. Die Geräte, die in Arzneimittelanalysen genutzt werden, beeinflussen mit ihren Daten die Sicherheit und die Wirksamkeit von Arzneimitteln und müssen garantieren, dass Arzneimittel für die geplante Anwendung geeignet sind. Ebenso wie andere leistungsstarke, analytische Techniken muss sich auch die Kapillarelektrophorese einer adäquaten Qualifizierung unterziehen.

Der Begriff „Analytical Instrument Qualification (AIQ)“, auf Deutsch Qualifizierung analytischer Instrumente, wurde auf einem Workshop der American Association of Pharmaceutical Scientist 2003 definiert. Die Ergebnisse dieses Workshops wurden im Nachhinein von Bansal et al. publiziert [123] und fanden als General Chapter <1058> auch Einzug ins US-amerikanische Arzneibuch (USP, Engl.: The United States Pharmacopoeia)[32]. Jedoch haben Kapitel im USP, die eine Nummer größer als 999

besitzen, nur einen empfehlenden Charakter. Bis heute bietet das Europäische Arzneibuch kein solches Kapitel an. In der Monographie 2.2.47 des Europäischen Arzneibuch über die Kapillarelektrophorese werden lediglich allgemeine Informationen zu der Technik und verschiedenen Methoden gegeben sowie Berechnungen vorgestellt [30].

4.1 Begriffe und Definitionen nach General Chapter <1058> des USPs

Eine einheitliche Nomenklatur ist in einem hochreguliertem Umfeld wie der pharmazeutischen Industrie notwendig, um in der internationalen Zusammenarbeit zwischen Herstellern und Behörden eine präzise Verständigung zu gewährleisten. Dies liefert das General Chapter <1058> und definiert weitere wichtige Begriffe.

Im Zuge der Vereinheitlichung schlägt das General Chapter folgende Definitionen vor: Herstellungsprozeduren, Analysemethoden und Software werden *validiert*, im Gegensatz dazu werden Instrumente *qualifiziert*. Die bis dahin übliche Nomenklatur, dass auch Instrumente validiert werden, ist nun nicht mehr gebräuchlich. Auch die verschiedenen Begriffe für die Qualifizierung, wie z.B. „Equipmentqualification“, wurden in der „Analytical Instrument Qualification (AIQ)“ zusammengefasst.

Die AIQ ist eine von vier Komponenten der Datenqualität und bildet die Basis für das in Abbildung 4-1 dargestellte Qualitätsmanagementsystem. Die drei weiteren Komponenten sind die Validierung der analytischen Methoden (Engl.: Analytical Method Validation), Systemeignungstests (SST, Engl.: System Suitability Test) und Qualitätskontrolltests (Engl.: Quality Control Check Samples).

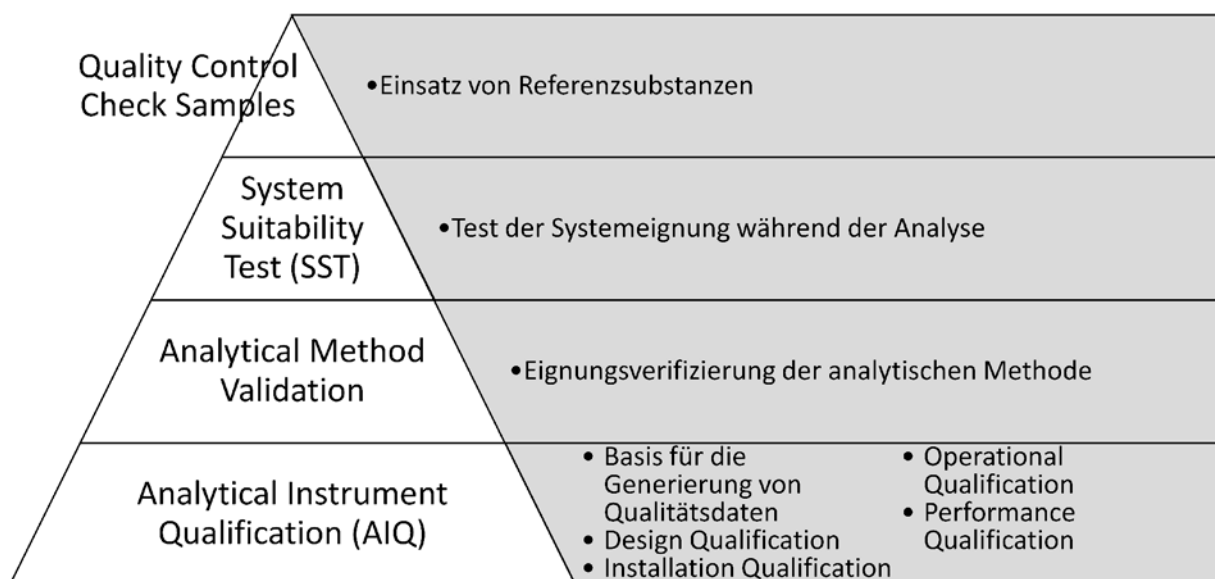


Abbildung 4-1: Dreieck der Datenqualität [123]

Die AIQ wird in Kapitel 4.1.1 beschrieben, alle weiteren Komponenten werden nachfolgend kurz erläutert. Die Validierung der analytischen Methoden sind die dokumentierten Beweise, dass eine analytische Prozedur für den vorgesehenen Gebrauch geeignet ist. Zusammen mit einem qualifizierten Instrument gibt die Validierung die Sicherheit, dass Daten mit akzeptabler Qualität erhalten werden. Richtlinien wurden für eine allgemeine Methodenvvalidierung in Referenz [125] und im Speziellen für die Kapillarelektrophorese in Referenz [20] veröffentlicht. Sowohl Qualifizierung als auch Validierung finden vor den eigentlichen Analysen statt. Systemeignungstests gehen mit einer Analyse einher, um die Systemeignung zeitnah zur Probe festzustellen. Sie überprüfen, ob das System (Methode und Instrument) nach vorher festgelegten Kriterien funktioniert. Zusätzlich werden während der Analyse als Qualitätskontrolltests Referenzsubstanzen für eine Kalibrierung und/oder für eine Inprozesskontrolle eingesetzt [32].

4.1.1 Die vier Abschnitte der Analytical Instrument Qualification

Die AIQ beruht auf einem lang bewährten Konzept, das die Qualifizierung eines analytischen Instrumentes in vier Abschnitte unterteilt. Bereits vor der Vereinheitlichung der Nomenklatur durch das General Chapter <1058> war dieses Konzept im Umlauf und wurde von vielen Autoren als Basis genutzt [123, 124, 126, 127]. Die Instrumentenqualifizierung ist kein einzelner, durchgehender Prozess, sondern besteht aus verschiedenen, separaten Schritten. Zwei Abschnitte, die Entwurfsqualifizierung (DQ, Engl.: Design Qualification) und die Installationsqualifizierung (IQ, Engl.: Installation Qualification), werden einmalig vor der Inbetriebnahme des Instrumentes durchgeführt, zwei weitere Abschnitte, die Funktionsqualifizierung (OQ, Engl.: Operational Qualification) und die Leistungsqualifizierung (PQ, Engl.: Performance Qualification), regelmäßig nach der Inbetriebnahme.

Der Lebenszyklus einer Kapillarelektrophorese mit den dazugehörigen Qualifizierungsphasen ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Der Nutzer selbst ist verantwortlich für die Arbeitsabläufe und für die Datenqualität eines analytischen Instrumentes und somit auch für die Qualifizierung. Der Hersteller ist in erster Linie für die DQ verantwortlich und sollte die Herstellung sowie den Zusammen- oder Einbau eines analytischen Instrumentes qualifizieren. Zusätzlich sollte der Hersteller seinen Anwendern Training anbieten und über mögliche Systemfehler informieren [32]. Durch Training der Hersteller und die tägliche Routine ist der Nutzer bestens ausgebildet und besitzt die Expertise, um sowohl Tests als auch Akzeptanzkriterien für eine Qualifizierung zu erarbeiten. Unterstützung können unter anderem Berater, Hersteller, Qualifizierungsspezialisten und Mitarbeiter der Qualitätssicherung geben, allerdings liegt die endgültige Verantwortung für ein analytisches Instrument laut General

Chapter <1058> beim Nutzer [32]. Es muss auch gesichert sein, dass ein analytisches Instrument im Betrieb durch regelmäßige Qualifizierungen durchgängig in einem qualifizierten Zustand ist.

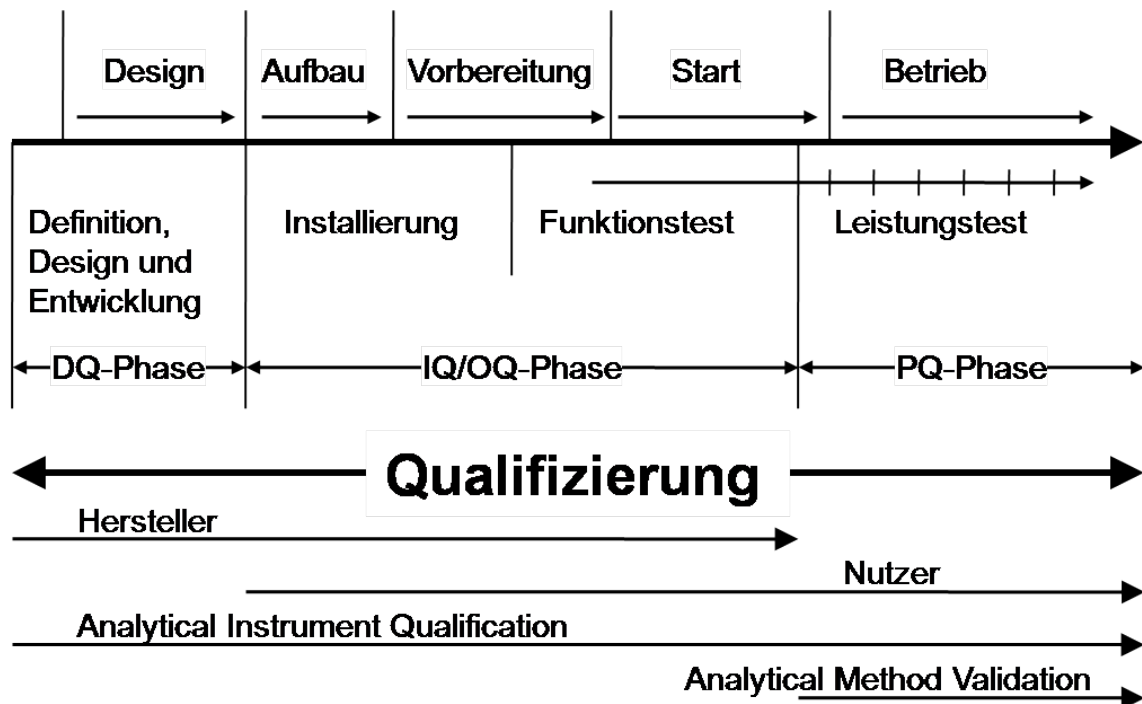


Abbildung 4-2: Die vier Qualifizierungsphasen im Lebenszyklus einer Kapillarelektrophorese nach [127]

In der letzten Phase der Qualifizierung kommt die nächste Stufe des Qualitätsmanagement, die Validierung von analytischen Methoden, hinzu. In der Darstellung des Qualitätsmanagements in den Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2 sehen die einzelnen Stufen und Abschnitte aus, als stehen sie für sich alleine. Dem ist jedoch nicht so. Um die Effizienz der Qualifizierung zu steigern können einzelne Qualifizierungstests zusammengelegt werden, also in einem holistischen Konzept durchgeführt werden. Alternativ können Informationen aus anderen Teilen des Qualitätsmanagementsystems für eine Qualifizierung genutzt werden. Weitere Ausführungen zur Effizienzsteigerung sind in den Kapiteln 4.3 und 4.4 zu finden.

4.1.1.1 Design Qualification

Die DQ ist der erste Abschnitt im Lebenszyklus eines analytischen Instrumentes. In diesem Abschnitt wird zuerst festgelegt, welche Aufgaben ein analytisches Instrument erfüllen und welche Spezifikationen es einhalten soll. Die Anforderungen werden in einem sogenannten Lastenheft (URS, Engl.: user requirement specifications) niedergeschrieben. Dies ist nicht nur die Aufgabe des Herstellers, auch der Anwender kann mitwirken, die Spezifikation für sein Instrument festzulegen. Dokumentiert werden dann die Funktionen und die

Spezifikationen für den vorgesehenen Gebrauch. Der Hersteller ist für ein robustes Design, Informationen über Designspezifikationen und Funktionsanforderungen, sowie für einen ersten Funktionstest vor der Auslieferung verantwortlich [32]. Mittlerweile werden alle komplexeren, analytischen Instrumente über einen Computer mit dazugehöriger Software gesteuert. Deswegen wird diese zusätzliche Hardware und Software mit zum analytischen Instrument gezählt und muss somit ebenfalls qualifiziert werden. Hier ist auch der Nutzer für die Qualifizierung verantwortlich, allerdings kann er Unterstützung des Herstellers z.B. in Form von Zertifikaten erhalten [127]. Da dem Nutzer die Expertise für die Qualifizierung von Computerhardware und Software fehlt, wird im General Chapter <1058> der Hersteller in die Pflicht genommen, Unterlagen zu der Funktionsfähigkeit zu liefern [32]. Während der späteren Qualifizierungen im Lebenszyklus eines analytischen Instrumentes kann dann eine Überprüfung entfallen. Für Instrumente in GxP-Umgebungen sind eventuell weitere Vorschriften maßgeblich für die Bewertung der Qualifizierung von Computerhardware und Software. Wenn ein kommerziell erhältliches, analytisches Instrument angeschafft werden soll, so muss der Nutzer prüfen, ob das Gerät seinen Anforderungen entspricht.

4.1.1.2 Installation Qualification

Der zweite Abschnitt der Qualifizierung handelt von der Lieferung eines analytischen Instrumentes und seiner Aufstellung. Zu beachten ist hier besonders die Wahl des Aufstellungsortes, der geeignet für das analytische Instrument und vom Hersteller spezifiziert sein muss. Nicht nur neue Instrumente müssen einer IQ unterzogen werden, auch gebraucht gekaufte, umgestellte oder eingelagerte Instrumente, sowie alle Instrumente, die noch nie qualifiziert wurden, müssen einmalig das Protokoll der IQ durchlaufen, das häufig von den Herstellern zur Verfügung gestellt wird [128].

Zur IQ gehören eine genaue Aufstellung aller Bestandteile mit Herstellerangaben, Seriennummern und Softwareversionen, eine Prüfung des Lieferumfangs, der Aufbau und die Installation, sowie ein erster Testlauf. Für den Aufbau und die Installierung des Systems sollten genaue Angaben des Herstellers zur Durchführung vorhanden sein, üblicherweise wird dieser Schritt selbst vom Hersteller realisiert. Dazu gehören neben dem eigentlichen Aufbau auch erste Testungen der einzelnen Systemkomponenten. Die IQ schließt mit einem Testlauf ab, im Fall der Kapillarelektrophorese wird eine konditionierte Kapillare eingesetzt, eine Referenzsubstanz injiziert und Spannung angelegt. Das entstehende Elektropherogramm muss den Spezifikationen des Herstellers genügen. Die Instruktionen des Herstellers beinhalten häufig Methoden und Akzeptanzkriterien für alle wichtigen Parameter. Die Akzeptanzkriterien sind so festgelegt, dass sie von einem neuen Instrument

eingehalten werden können. Diese können nicht auf eine Qualifizierung eines regelmäßig genutzten Gerätes übertragen werden.

4.1.1.3 Operational Qualification

Während der OQ wird die Funktionsfähigkeit eines analytischen Instrumentes geprüft. Die erste OQ schließt sich an die IQ an. Es werden die nachfolgenden Bereiche abgeprüft:

- Definierte Parameter (Höhe, Länge, Gewicht, Spannung, Druck)
- Datenspeicherung, Sicherungskopien, Archivierung
- Instrumentenfunktionstests

Die zwei ersten Punkte der Aufzählung können für die meisten analytischen Instrumente auf die gleiche Weise geprüft werden. Demgegenüber müssen Instrumentenfunktionstests und die dazugehörigen Akzeptanzkriterien auf die Art und den Zweck des Instruments abgestimmt werden. Während der Tests werden die einzelnen Funktionen des Instrumentes nach Herstellerspezifikationen getestet. Durchgeführt werden die Tests allerdings vom Nutzer, entweder modular, also jede Komponente für sich, oder holistisch, so dass das analytische Instrument als komplettes System getestet wird. Ein modularer Testaufbau ermöglicht, dass einzelne Komponenten ausgetauscht werden können, ohne dass eine komplette Requalifizierung erforderlich wird. Im Gegensatz dazu ist der holistische Test wesentlich schneller, muss aber nach jeder Reparatur komplett durchgeführt werden. Nach größeren Reparaturen, aber auch nach einem Standortwechsel eines analytischen Instrumentes sollte eine Funktionsqualifizierung erfolgen.

4.1.1.4 Performance Qualification

Der letzte Abschnitt der Qualifizierung begleitet ein Instrument regelmäßig im Lebenszyklus. Die PQ soll die lückenlose Leistung des analytischen Instruments dokumentieren und die Eignung für den vorgesehenen Gebrauch gewährleisten. Es wird eine Testserie durchgeführt, standardmäßig mit einem hauseigenen Test und Referenzsubstanzen. Gut geeignet sind auch Systemeignungstests oder eine Referenzprobe der Qualitätskontrolle [32]. In dieser Serie werden meist die gleichen Parameter wie in der OQ geprüft, allerdings werden in der PQ andere Spezifikationen als in der OQ gewählt. Die PQ soll den Nachweis erbringen, dass das analytische Instrument einwandfrei arbeitet. Hierfür ist der Nutzer gefordert, für seine Anwendung des analytischen Instrumentes Tests und Akzeptanzkriterien zu erarbeiten, die seiner gewünschten Leistung entsprechen. Auch die PQ kann wie die OQ modular oder holistisch durchgeführt werden. Die Testfrequenz ist dabei abhängig von der Empfindlichkeit kritischer Parameter. Es empfiehlt sich, kritische Parameter bei jeder Benutzung des Instrumentes zu testen. Besonders bei den komplexen Instrumenten wie der

Kapillarelektrophorese muss auf die Parameter Acht gegeben werden, die einen direkten Einfluss auf die qualitativen und quantitativen Daten haben. Die Referenzen [32] und [127] geben für die Frequenz nur vage und sehr großzügige Intervalle an. So soll nach Ross [127] mindestens einmal im Jahr eine PQ durchgeführt werden. Zusätzlich sollte nach großen Reparaturen und vor der Optimierung und Validierung von Methoden die Leistungsfähigkeit eines analytischen Instrumentes überprüft werden.

Wenn eine Qualifizierung fehlschlägt, so folgt eine Wartung und Reparatur des Instrumentes, sowie eine weitere Qualifizierung. In der pharmazeutischen Industrie müssen zusätzlich auch alle Ergebnisse, die seit der letzten bestandenen Qualifizierung erhalten wurden, intensiv nachgeprüft werden. Im ungünstigsten Fall kann es dadurch zu einem Chargenrückruf kommen [129]. Um diesen Fall zu vermeiden, ist es wichtig die Leistung eines analytischen Instrumentes kontinuierlich zu überwachen.

Im weiteren Verlauf werden hauptsächlich die OQ und die PQ diskutiert, da sie für die fortlaufende Leistungsbeurteilung eines analytischen Instrumentes verantwortlich sind.

4.1.2 Kategorisierung von analytischen Instrumenten

Aus wissenschaftlicher und auch aus ökonomischer Sicht ist es nicht sinnvoll alle analytischen Instrumente, die in einem Labor vorhanden sind, nach den gleichen Vorgaben zu qualifizieren. Da der Anwender für die Qualifizierung seiner Instrumente verantwortlich ist, bestimmt er auch das Niveau der Qualifizierung. Das General Chapter <1058> schlägt die Einteilung in drei Gruppen vor, die unterschiedlich intensiv qualifiziert werden sollen [32]. Je nach den individuellen Anforderungen an das Instrument seitens des Nutzers kann ein und dasselbe Instrument in unterschiedliche Gruppen fallen. Die USP mahnt deswegen zu einer sorgfältigen Einsortierung in die Gruppen [32].

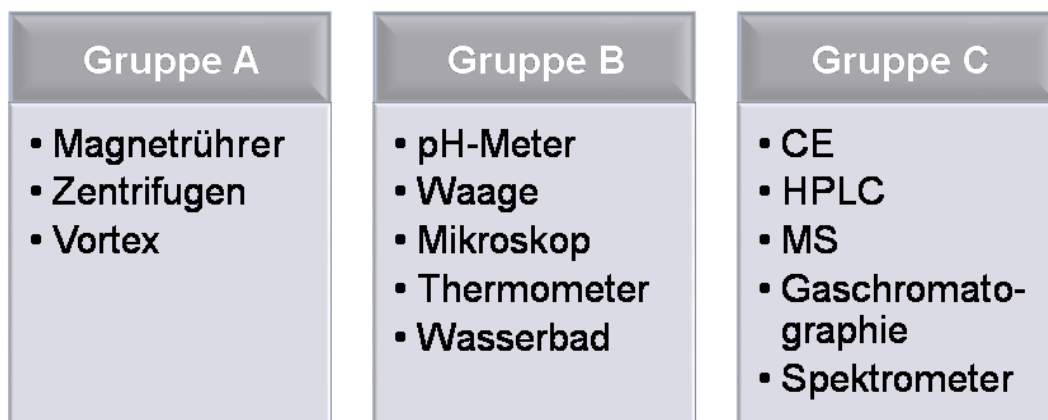


Abbildung 4-3: Kategorisierung von analytischen Instrumenten

In die Gruppe A werden Standardgeräte ohne Messfunktion und Kalibrierung einsortiert. Eine unabhängige Qualifizierung ist bei diesen Geräten nicht notwendig, eine visuelle Überprüfung der Funktion genügt in den meisten Fällen. Die Herstellerspezifikationen können als Anforderungen für den Anwender eingesetzt werden. Beispiele für Instrumente sind im General Chapter <1058> [32] und in Abbildung 4-3 aufgeführt.

Instrumente mit einer Messfunktion oder einer Kontrollfunktion für physikalische Parameter (z.B. Temperatur, Druck) gehören zu Gruppe B. Diese Instrumente benötigen normalerweise auch eine Kalibrierung. Für die Qualifizierung können SOPs auf der Grundlage der Herstellerspezifikationen erarbeitet werden. Die Konformität mit den Anforderungen ist in der Regel eindeutig. Instrumente, wie z.B. Thermometer, Manometer, Waage usw., werden in dieser Gruppe einsortiert (siehe für weitere Beispiele Referenz [32] und Abbildung 4-3).

Die Gruppe C beinhaltet die komplexen, computergesteuerten Instrumente. Die Anforderungen an die Funktionalität, die Funktions- und Leistungsparameter sind bei diesen Instrumenten abhängig von der vorgesehenen Anwendung. Zum Einsatz kommen spezielle Tests auf die Funktion und die Leistung der Instrumente. Der komplette, vorgestellte Ablauf der AIQ sollte für diese Instrumente durchlaufen werden. Die Beispiele aus Abbildung 4-3 und Referenz [32] sind nur ein Ausschnitt der Instrumente, die nach den Vorgaben dieser Gruppe geprüft werden müssen. Die Kapillarelektrophorese mit ihren Modulen – Spannungsquelle, Kapillare, Injektionseinrichtung, Druck, Detektor, Computer, Software – gehört natürlich zur dieser Gruppe der analytischen Instrumente.

4.2 Entwicklung einer Parameterliste für die Kapillarelektrophorese

Der Einsatzzweck von analytischen Instrumenten ist die Erzeugung von zuverlässigen, analytischen Daten. Die Einführung des Qualifizierungsprozesses in die tägliche Laborarbeit verhindert die Mehrdeutigkeit von Analyseergebnissen. Bevor das General Chapter <1058> in das USP Einzug fand, wurden nur einige, wenige Publikationen zu diesem Thema veröffentlicht. Die „UK Instrumentation Working Group of the Laboratory of the Government Chemist“ präsentierte 1996 den ersten, universellen Ansatz für die Qualifizierung [124]. Huber et al. [130] publizierten kurz danach die Arbeiten zur Auswahl von Parametern und Grenzen für die Funktionsqualifizierung von Instrumenten. Die Arbeit der britischen Gruppe wurde 1999 erweitert und an die HPLC angepasst [126]. Für die CE publizierte Ross die ersten Vorschläge für Parameter und Akzeptanzkriterien [127]. Seit den Arbeiten von Bansal et al. [123] 2004, die zum General Chapter <1058> führten, wurden einige alternative Konzepte sowohl für HPLC [131], als auch CE entwickelt [132, 133].

Die aktuelle Literatur über die Qualifizierung von CE-Systemen stellt verschiedene Listen mit Parametern und Akzeptanzkriterien vor. Bis heute sind diese nur Empfehlungen, denn noch sind keine verbindlichen Richtlinien vorhanden. Auch enthalten alle publizierten Listen unterschiedliche Parameter und Akzeptanzkriterien oder sogar eine andere Vorgehensweise. Puttock [133] beschreibt die Qualifizierung mit einem Werkzeug des Risikomanagements, die „Failure mode effects and criticality analysis“. Die vorgeschlagenen Parameter und Akzeptanzkriterien aus den bereits publizierten Qualifizierungsanweisungen wurden als Basis genutzt, um eine definierte Qualifizierungsprozedur zu entwickeln. Diese Prozedur ist als Zusammenfassung in Tabelle 4-1 dargestellt. Insgesamt wird auf 11 Parameter geprüft. Nicht alle Parameter besitzen den gleichen Einfluss auf die Datenqualität. Kombinationen von Parametern für verschiedene Fragestellungen werden in Kapitel 4.3 und 4.4 vorgestellt. Wie bereits in Kapitel 4.1.1.1 erläutert, ist die Qualifizierung von Computerhardware und Software kein Bestandteil der Funktions- oder Leistungsqualifizierung.

Die Qualifizierung von so komplexen, analytischen Instrumenten, wie z.B. der Kapillarelektrophorese oder der Flüssigkeitschromatographie sollte mit möglichst einfachen Methoden durchgeführt werden. Eine effiziente AIQ für die HPLC wurde bereits von Kaminski et al. [131] erarbeitet. Für die Kapillarelektrophorese wurde als Basismethode der sogenannte Gerätetest aus Referenz [134] genutzt. Abbildung 4-4 zeigt ein typisches Elektropherogramm, alle weiteren Details zur Methode sind in Tabelle 4-1 und Kapitel 8.4 zusammengestellt.

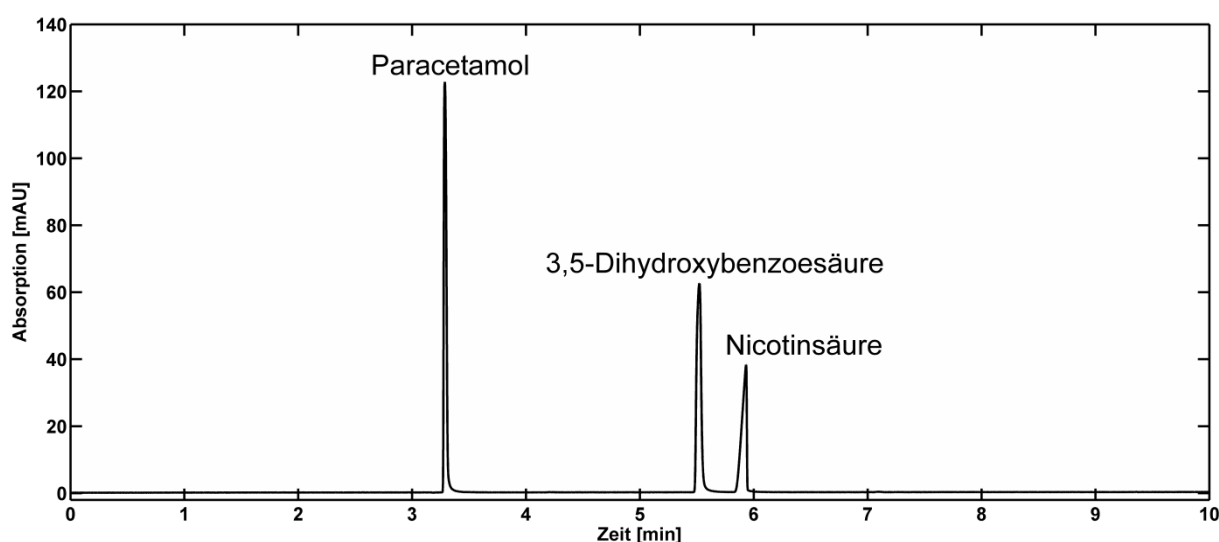


Abbildung 4-4: Elektropherogramm der Standardmethode für die AIQ; Das Gemisch wurde auf einer Agilent 1600 CE mit einer Kapillarlänge von 52 cm effektiv und 60 cm total getrennt. (vgl. Kapitel 8.4)

Tabelle 4-1 fasst die einzelnen Prüfungsmethoden für jeden Parameter zusammen und beinhaltet Vorschläge für Akzeptanzkriterien. Über die Signifikanz, mögliche Testmethoden

und die Spannweite der Akzeptanzkriterien von jedem Parameter, der eine Auswirkung auf die Ergebnisse in der CE hat, wird nachfolgend diskutiert.

Tabelle 4-1: Parameter, ihre Testmethoden und Akzeptanzkriterien

Modul	Parameter	Methode	Akzeptanzkriterium
Temperatur	Stabilität	Während einer Trennung ohne Probeninjektion wird die Temperatur über 10 min aufgezeichnet. Getestet werden ein niedriger, ein hoher und ein häufig eingesetzter Temperaturwert, z.B. das untere und obere Limit der einstellbaren Temperatur sowie ein Wert zwischen 20-25°C.	$\pm 0,1^\circ\text{C}$
	Richtigkeit	Während der Prüfung auf Temperaturstabilität wird mit einem externen Thermometer die Temperatur in dem Areal gemessen, das auf den eingestellten Wert temperiert ist.	$\pm 2^\circ\text{C}$
	Kühlungssystem	Abhängig von der Kapillarlänge werden ein Puffer und eine adäquate Spannung gewählt. Aufgrund des entstehenden Stroms und der resultierenden Leistung pro Länge kann entschieden werden, ob das Kühlsystem hinreichend arbeitet oder nicht (Siehe auch Tabelle 3-4).	Kapillarlänge $> 0,6\text{ m} \rightarrow 3\text{ W/m}$ $< 0,6\text{ m} \rightarrow 5\text{ W/m}$
Spannung	Stabilität	Während einer Trennung ohne Probeninjektion wird die Spannung über 10 min aufgezeichnet. Getestet werden ein hoher ein niedriger und ein häufig eingesetzter Spannungswert, z.B. das obere Limit der einstellbaren Spannung sowie Werte zwischen 5-15 kV und 20-25 kV.	$\pm 0,5\%$
	Richtigkeit	Eine Probe, die Acetanilid, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure	$\pm 4\%$

		enthält, wird getrennt. Die effektiven Mobilitäten werden nach Gleichung 40 berechnet und mit einem Referenzinstrument verglichen.	
Detektor	Rauschen (Drift)	Während einer Trennung ohne Probeninjektion wird die Absorption über 10 min aufgezeichnet. Getestet wird eine häufig eingesetzte Wellenlänge, z.B. die Wellenlänge des Gerätetestes von 254 nm. Die Standardabweichung wird aus der Absorption berechnet.	$<5 \cdot 10^{-5} \text{ AU}$
	Wellenlängen-richtigkeit	Die Spektren von den drei Probesubstanzen werden gemessen und die Maxima der Substanzen ausgewertet.	$\pm 3 \text{ nm}$
	Linearität	Verschiedene Probenkonzentrationen, die einen Bereich von $0,1 - 5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ abdecken, werden getrennt. Eine lineare Regression wird über die Konzentrationen der einzelnen Substanzen und die korrespondierenden Peakflächen berechnet. Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird als Akzeptanzkriterium ermittelt.	$R^2 > 0,99$
Injektion	Richtigkeit (hydro-dynamisch)	Vier gewogene Vials werden mit Wasser gefüllt und wieder gewogen. Einhundert Injektionen bei 50 mbar über 1 min werden bei 20°C aus dem ersten in das zweite Vial durchgeführt. Am Schluss werden alle vier Vials wieder gewogen. Die zwei ungenutzten werden verwendet, um den Verdunstungseffekt zu berechnen. Die Soll-Injektionsmenge wird nach der Gleichung von Hagen und Poiseuille berechnet (siehe auch Gleichung 41)	$\pm 25 \%$
	Linearität	Es werden unterschiedliche Injektionsmengen ($100 - 500 \text{ mbar} \cdot \text{sec}$) eingesetzt. Eine lineare Regression wird	$R^2 > 0,99$

	über das Produkt aus Injektionszeit und Injektionsdruck und den korrespondierenden Peakflächen berechnet. Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird als Akzeptanzkriterium ermittelt.	
Präzision	Die relativen Standardabweichungen von der Peakfläche und der Migrationszeit werden aus sechs aufeinanderfolgenden Trennungen der gleichen Probe berechnet.	Migrationszeit: RSD<1,5% Peakfläche: RSD<2%

4.2.1 Temperatur

Die Entstehung von Joulescher Wärme ist in der Elektrophorese unvermeidbar, da aus der angelegten Spannung und dem entstehenden Stromfluss Leistung in Form von Wärmeenergie frei wird. Die Zusammenhänge werden ausführlich in Kapitel 2.2.3 und im gesamten Kapitel 3 diskutiert. Die richtige Einstellung der Kapillartemperatur ist essentiell für reproduzierbare Migrationszeiten und Peakflächen und muss in einem Qualifizierungsprotokoll getestet werden. Die Stabilität und die Richtigkeit der Temperatureinstellung, sowie die Funktionalität des Kühlsystems sollten Einzug in das Protokoll finden.

Die Temperaturstabilität kann sehr einfach gemessen werden, wenn die Software des CE-Systems ein Temperaturprofil während einer Trennung aufnehmen kann (Tabelle 4-1). Falls diese Funktion nicht unterstützt wird, was gerade bei älteren Instrumenten der Fall sein könnte, muss ein externes Thermometer mit Aufnahmefunktion eingesetzt werden. Eine Messfrequenz von mindestens 1 Hz sollte für diese Prüfung gegeben sein. Ein externes Thermometer wird immer für die Überprüfung der Richtigkeit benötigt. Dies kann allerdings Probleme bei der Realisierung der Prüfung für CE-Systeme mit Flüssigkühlung geben. Wie bereits im Kapitel 3.2 beschrieben, kann mit wenig Aufwand ein externes Thermometer (z.B. IR-Thermometer) in den CE-Systemen von Agilent und Prince eingebaut werden.

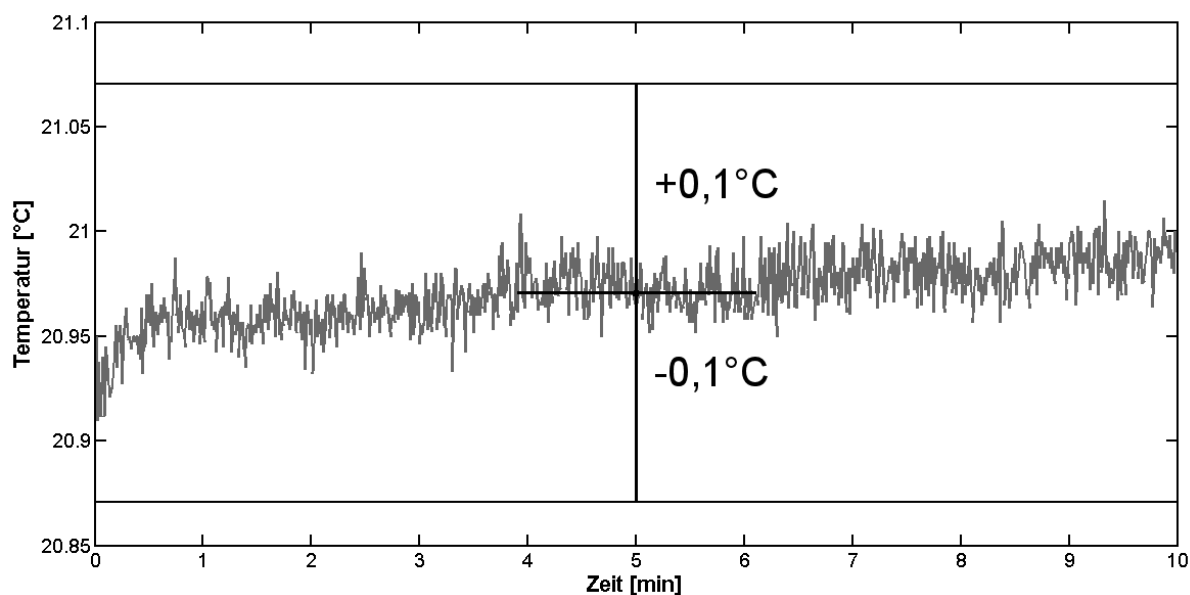


Abbildung 4-5: Prüfung auf Temperaturstabilität nach Tabelle 4-1

Das Kühlungssystem kann in der täglichen Routine überprüft werden, wenn der entstehende Strom unter definierten Testbedingungen gemessen wird. Wenn das Kühlungssystem nicht adäquat arbeitet, so überschreitet die Stromstärke die Grenzen, die in Kapitel 3.8 definiert wurden. Dieser Test kann auch für CE-Systeme mit Flüssigkühlung durchgeführt werden, vorausgesetzt man kann den Verlauf der Stromstärke verfolgen. Eine vorherige Temperaturmessung, wie sie für die Entwicklung des Tests genutzt wurde, ist nicht mehr nötig.

In der Literatur [127, 132, 133] lassen sich verschiedene Akzeptanzwerte finden, allerdings sind sie teilweise nur für die Stabilität und nicht für die Richtigkeit definiert. Für die Stabilität reichen die Werte von $\pm 0,1^\circ\text{C}$ bis $\pm 2^\circ\text{C}$. Im Vergleich dazu definiert nur Ross ein Akzeptanzkriterium von $\pm 1^\circ\text{C}$ für die Temperaturrichtigkeit [127]. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, dass die Temperatur stabil über die gesamte Trennung gehalten wird. Weniger wichtig ist es, dass die Temperatur akkurat auf einen bestimmten Wert eingestellt ist. Deswegen wird das Akzeptanzkriterium für die Stabilität mit $\pm 0,1^\circ\text{C}$ sehr eng gewählt. Im Gegensatz dazu kann das Akzeptanzkriterium für die Richtigkeit mit einem Wert von $\pm 2^\circ\text{C}$ weiter gefasst werden.

4.2.2 Spannung

Die Spannung ist einer der zentralen Parameter der Kapillarelektrophorese. Diese hat direkten Einfluss auf die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten [127]. Demzufolge müssen Stabilität und Richtigkeit der Spannung getestet werden.

Die Spannungsstabilität kann wie die Stabilität der Temperatur gemessen werden, vorausgesetzt, dass die Spannung während der Trennung aufgezeichnet werden kann. Die Vorschläge der Literatur zum Akzeptanzkriterium reichen von $\pm 0,1\%$ bis $\pm 1\%$ des festgesetzten Spannungswertes [127, 132, 133]. Ein Akzeptanzkriterium von $\pm 1\%$ für einen so wichtigen Parameter ist zu großzügig gesetzt. Gleichung 6 zeigt deutlich, welchen Einfluss die Feldstärke, also die Spannung pro Kapillarlänge, auf die Geschwindigkeit von Analyten hat. Wenn eine hohe Variabilität bereits für die Spannung zugelassen wird, so muss für die Präzision der Migrationszeit eine noch höhere Variabilität festgelegt werden, um Schwankungen sowohl der Spannung als auch der weiteren Parameter, die einen Einfluss auf die Migrationszeit haben, zu berücksichtigen. Auf der anderen Seite ist ein Wert von $\pm 0,1\%$ unter Laborbedingungen schwerlich einzuhalten. Als Kompromiss wird ein Akzeptanzkriterium von $\pm 0,5\%$ des mittleren Spannungswertes vorgeschlagen. Die Richtigkeit der Spannung wird in einer zweiten Prüfung getestet (siehe unten). Abbildung 4-6 zeigt ein typisches Verhalten der Spannung über die Zeit. Ein wesentlich engeres Akzeptanzkriterium würde in diesem Beispiel bereits dazu führen, dass die Prüfung nicht bestanden würde.

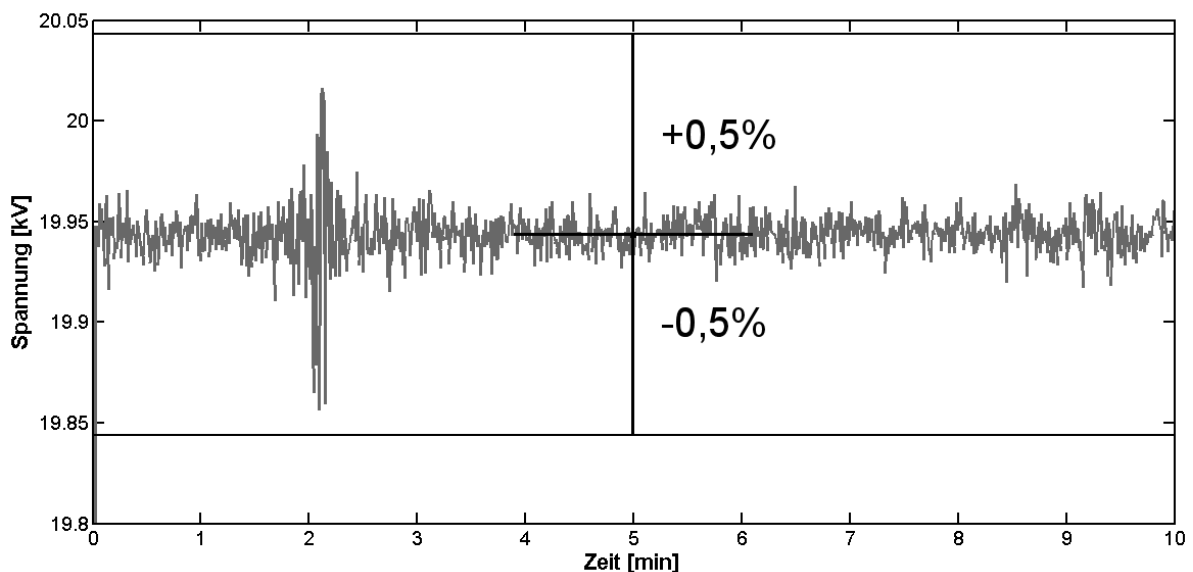


Abbildung 4-6: Prüfung auf Spannungsstabilität nach Tabelle 4-1

Eine direkte Messung der Spannungsrichtigkeit erweist sich als schwierig, da die Elektroden für eine unabhängige Messung der Spannung während einer Trennung nicht zugänglich sind. Allerdings kann die Spannungsrichtigkeit einfach indirekt aus den effektiven Mobilitäten der Probesubstanzen berechnet werden.

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{eof}} = \frac{L \cdot l \cdot (t_{\text{eof}} - t_s)}{U \cdot t_{\text{eof}} \cdot t_s}$$

l effektive Kapillarlänge [m]

t_{eof} Migrationszeit des EOF-Markers [s]

t_s Migrationszeit Probesubstanz [s]

Gleichung 40: Berechnung der effektiven Mobilität

Gleichung 40 präsentiert den Zusammenhang zwischen der effektiven Mobilität (μ_{eff}) und der angelegten Spannung (U). Die totale Länge (L), die effektive Länge (l), die Migrationszeiten eines EOF-Markers (t_{eof}) und einer Probesubstanz (t_s) werden ebenfalls benötigt. Der EOF wird mit dem weit verbreiteten EOF-Marker Acetanilid gemessen. Dieser interferiert mit dem Paracetamol-Peak, so dass die Probe für die Spannungsrichtigkeit Acetanilid, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure enthält. Abbildung 4-7 zeigt Elektropherogramme von zwei unterschiedlichen CE-Systemen, wobei das neuere Modell (Agilent 1600) als Referenz eingesetzt wurde und die zweite CE (PrinCE 550) gegen diese verglichen wurde.

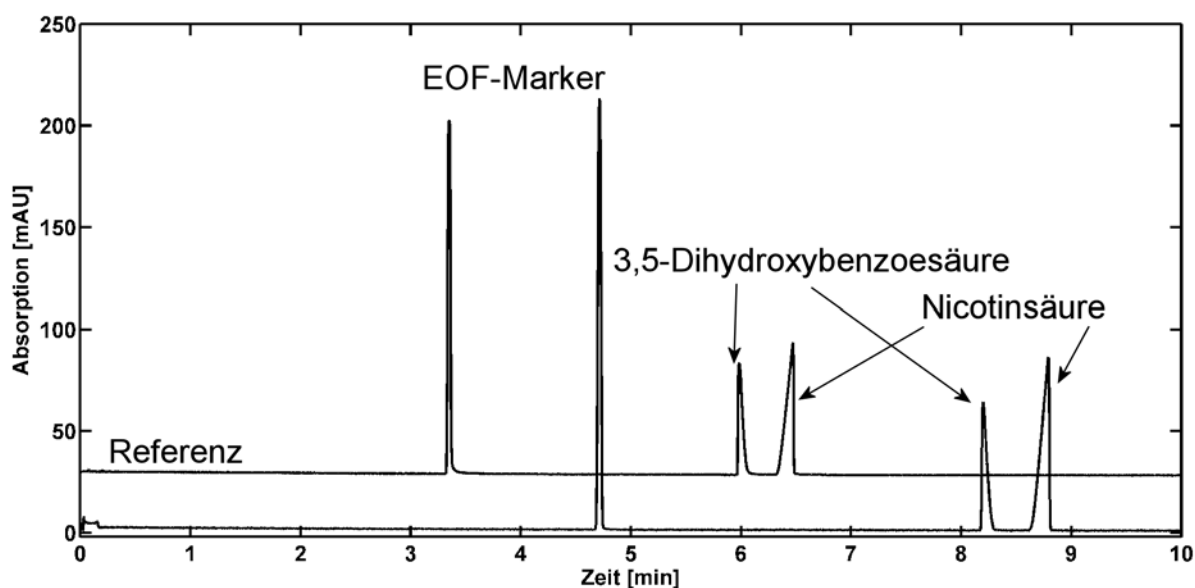


Abbildung 4-7: Prüfung auf Spannungsrichtigkeit mit einer Probe aus Acetanilid als EOF-Marker, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure gegen ein Referenzinstrument

Als Akzeptanzkriterium werden für die Spannungsrichtigkeit Werte von $\pm 1\%$ bis $\pm 4\%$ vom gesetzten Spannungswert in der Literatur diskutiert [127, 133]. Im Vergleich mit der Prüfung auf Spannungsstabilität und dem dort eng gefassten Akzeptanzkriterium von $\pm 0,5\%$ kann die Toleranz für die Spannungsrichtigkeit mit $\pm 4\%$ weiter gefasst werden. Unterschiede in der Spannung zwischen zwei CE-Systeme werden keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten nehmen. Tabelle 4-2 präsentiert die Ergebnisse aus Abbildung 4-7. Das Instrument in der Qualifizierung ist deutlich innerhalb des gewählten Bereiches von $\pm 4\%$.

Tabelle 4-2: Vergleich der effektiven Mobilitäten für die Prüfung auf Spannungsrichtigkeit

	3,5-Dihydroxybenzoesäure	Nicotinsäure
Instrument in der Qualifizierung	$2,77 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$	$3,02 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$
Referenzinstrument	$2,74 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs} \pm 4\%$	$3,01 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs} \pm 4\%$

4.2.3 Detektor

Für Detektoren, die in der HPLC genutzt werden, existiert bereits ein etabliertes Qualifizierungskonzept [131]. In weiten Teilen kann dieses auch in der Kapillarelektrophorese eingesetzt werden, da der gebräuchlichste Detektor in beiden Techniken ein UV-VIS-Detektor ist. Allerdings müssen die Akzeptanzkriterien für die drei Parameter Rauschen, Wellenlängenrichtigkeit und Linearität angepasst werden, da der optische Weg in der Kapillarelektrophorese wesentlich kürzer ist. In der HPLC werden Durchflusszellen mit einer Schichtdicke von bis zu 10 mm genutzt. Im Gegensatz dazu ist der Kapillarinne Durchmesser in der CE für die Schichtdicke maßgeblich. Üblicherweise liegt diese zwischen 50 und 100 μm . Nachfolgend werden alle drei Parameter hinsichtlich ihrer Relevanz, ihrer Bestimmung und ihres Akzeptanzkriteriums diskutiert.

Das dynamische Rauschen kann während einer Trennung ohne Probeninjektion einfach bestimmt werden (siehe auch Tabelle 4-1 und Kapitel 8.4). Die Absorption wird während der 10-minütigen Trennung aufgezeichnet und als Ergebnis wird die Standardabweichung der Absorption berechnet. Im Qualifizierungskonzept für die HPLC diskutierten Kaminski et al. [131], dass ein Akzeptanzkriterium für dynamisches Rauschen von $1 \cdot 10^{-3}$ AU ausreichend ist. Dieser Wert würde einem statischen Rauschen von $1 \cdot 10^{-4}$ AU entsprechen. Der Unterschied zwischen statischem und dynamischem Rauschen sind die zusätzlichen Turbulenzen, die in der Durchflusszelle des HPLC-Detektors das Rauschen erhöhen. Ein noch höheres Rauschen würde dann bereits die Leistungsfähigkeit der Methode beeinträchtigen. Um auf der sicheren Seite zu sein, geben die Hersteller von HPLC-Detektoren sogar einen Akzeptanzwert von $5 \cdot 10^{-5}$ AU für das Rauschen vor, gemessen unter statischen Bedingungen während der OQ.

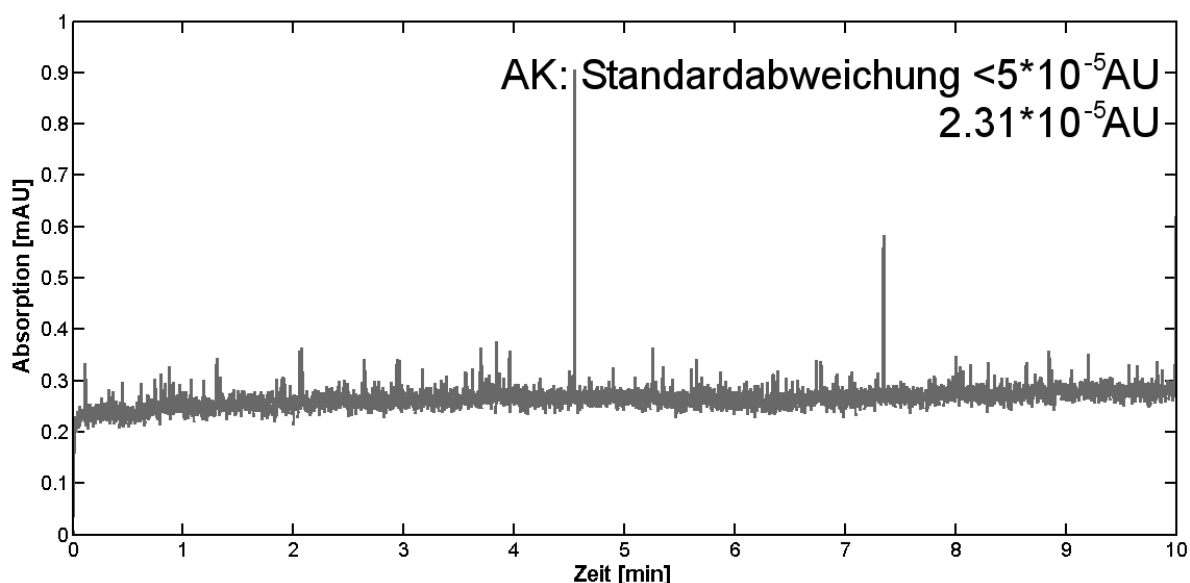


Abbildung 4-8: Prüfung auf das Rauschen des Detektors, aufgezeichnet während einer Trennung ohne Probeninjektion; Sowohl das Akzeptanzkriterium (AK) als auch das Ergebnis der Prüfung sind im Elektropherogramm vermerkt.

In der Kapillarelektrophorese wirkt sich das Rauschen aufgrund des kürzeren, optischen Weges stärker auf das Signal-Rausch-Verhältnis aus (Gleichung 2 in Kapitel 2.1.3.1). Deswegen ist nur ein enges Akzeptanzkriterium von $5 \cdot 10^{-5}$ AU für dynamisches Rauschen akzeptabel. Dieser Wert, ausgewertet als Standardabweichung, findet sich auch in Referenz [132] wieder. Die Drift der Basislinie ist vor allem ein Problem in der HPLC, da eine Drift auf die Nutzung von Gradienten zurückzuführen ist. Da üblicherweise in der CE keine Gradienten verwendet werden, ist keine zusätzliche Prüfung notwendig. Falls dennoch eine Drift auftritt, so wird diese mit der Prüfung auf Rauschen und dem gesetzten Akzeptanzkriterium ebenfalls detektiert.

Einige CE-Systeme nutzen als interne Wellenlängenkalibrierung einen Holmiumoxid-Filter, der Absorptionsmaxima im Bereich von 200-650 nm hat [128]. Andere CE-Systeme, besonders solche mit einem externen Detektor wie die Instrumente des Herstellers PrinCE, sind auf eine zusätzliche Prüfung für die Wellenlängenrichtigkeit angewiesen. Außerdem absorbieren die meisten niedrigmolekulare Arzneistoffe und Proteine im Bereich unter 300 nm, so dass eine Prüfung speziell für diesen Wellenlängenbereich in der AIQ notwendig wird. Viele Substanzen besitzen charakteristische UV-Spektren, wie auch die im Gerätetest eingesetzten Paracetamol, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure, und sind somit geeignet als Wellenlängenstandard eingesetzt zu werden. Insgesamt können mit der genutzten Mischung fünf Maxima mit Referenzwerten verglichen werden, die z.B. mit einem UV-Spektrometer aufgezeichnet wurden.

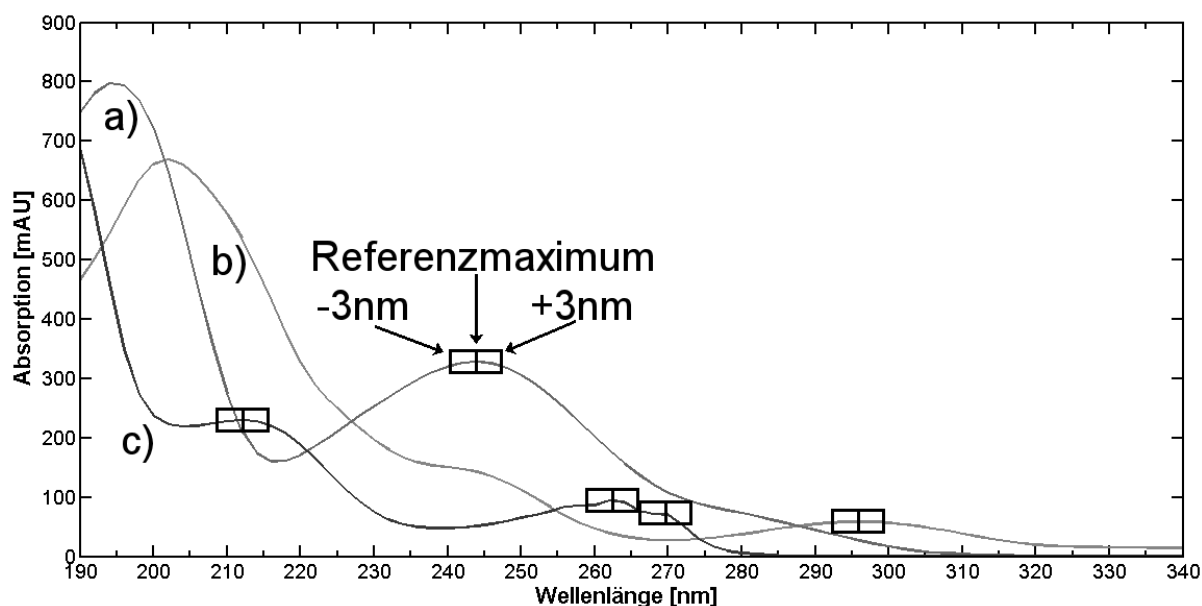


Abbildung 4-9: Spektren von a) Paracetamol, b) 3,5-Dihydroxybenzoesäure und c) Nicotinsäure aufgenommen während einer Trennung mit Probeninjektion mit dem DAD der Agilent 1600 CE; Zusätzlich zeigen die eingezeichneten Kästen das Maximum der Referenz und die dazugehörigen Grenzen von ± 3 nm.

Wenn die Kapillarelektrophorese mit einem Diodenarraydetektor (DAD) ausgestattet ist, so kann die Prüfung gleichzeitig mit anderen Prüfungen durchgeführt werden, in denen die Probensubstanzen eingesetzt werden. Ohne einen DAD müssen verschiedene Wellenlängen um die Maxima herum eingestellt und für jede einzelne Wellenlänge eine Trennung durchgeführt werden. Die Peakflächen oder –höhen können dann genutzt werden um das Wellenlängenmaximum zu bestimmen (siehe Kapitel 8.4.3.2 und Anhang 10.2.1).

Die Prüfung der Linearität des Detektors kann mit unterschiedlichem Aufwand in der OQ und der PQ durchgeführt werden. Während der OQ wird die Linearität mit jeweils acht Messungen für drei Konzentrationen bestimmt. Man erreicht so die geforderte Untergrenze des Stichprobenumfangs von mindestens 20 Messungen. In der Laborroutine reichen dann für eine Rekalibrierung während der PQ jeweils drei Messungen für zwei Konzentrationen aus, um zu evaluieren, ob die Linearität noch gegeben ist [135].

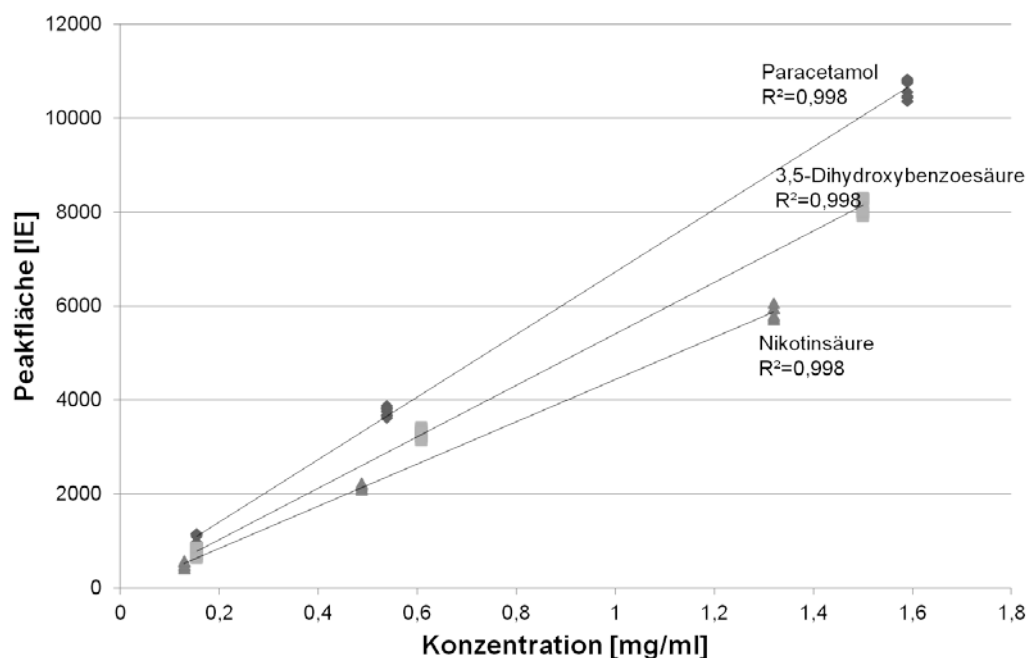


Abbildung 4-10: Prüfung auf Linearität des Detektors während eine OQ mit 8 x 3 Messungen

Als Akzeptanzkriterium für die Linearität wird das Bestimmtheitsmaß R^2 genutzt. Dies sollte größer als 0,99 sein (Abbildung 4-10). Dafür wird eine lineare Regression mit den Peakflächen der 8 x 3-Messungen und den entsprechenden Konzentrationen berechnet. Die Daten und die daraus resultierende lineare Regression, die man während einer PQ gewinnt, werden mit den Daten und Parametern der linearen Regression der letzten OQ verglichen. Die Parameter der linearen Regression von PQ und OQ dürfen keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Wenn die Prüfung auf Linearität nicht bestanden wird, so muss die Linearität mit einer 8 x 3-Messung für die PQ demonstriert werden.

In der HPLC wurde das Akzeptanzkriterium für die Linearität auf $R^2 \geq 0,999$ festgelegt [131]. Das Akzeptanzkriterium in der CE muss durch den Verlust an Sensitivität durch den kürzeren, optischen Lichtweg etwas weiter gefasst werden. Eine zusätzliche visuelle Überprüfung der Graphen sollte immer durchgeführt werden, wenn ein Bestimmtheitsmaß berechnet wird. Im Allgemeinen kann auch ein Diagramm mit Residuen helfen um Nichtlinearität oder Trends zu erkennen [136].

4.2.4 Injektion

In den meisten Fällen werden zwei Injektionsmodi in der Kapillarelektrophorese eingesetzt, die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion. Es ist üblich, dass die hydrodynamische Injektion in der Routine zur Anwendung kommt, da die Reproduzierbarkeit der Migrationszeit und der Peakfläche höher ist als nach elektrokinetischer Injektion. Die

hydrodynamische Injektion ist eine nicht-selektive Methode, was aber in den meisten Fällen ein Vorteil ist. Nur für spezielle Fragestellungen, wenn eine höhere Sensitivität und/oder Selektivität benötigt wird, setzt man die elektrokinetische Injektion ein [137]. Deswegen wird im Weiteren nur die hydrodynamische Injektion diskutiert. Natürlich können ähnliche Methoden, wie nachfolgend erläutert, für die elektrokinetische Injektion entwickelt werden, in dem man oft benutzte Werte für Injektionszeit und Injektionsspannung als Grundlage nimmt.

Bis jetzt enthält keine der Parameterlisten in der Literatur die Injektionsrichtigkeit. Tatsächlich nimmt diese Prüfung nur eine untergeordnete Rolle ein. Dieser Parameter wurde in Tabelle 4-1 mit berücksichtigt, um ein komplettes Konzept zusammen mit Linearität und Präzision der Injektion zu liefern. Unter diesen Umständen ist das Akzeptanzkriterium auch mit $\pm 25\%$ sehr weit gefasst. Verantwortlich für dieses Akzeptanzkriterium sind unter anderem die teilweise schwankenden Innendurchmesser der Kapillare und die Annahme von Konstanten in der folgenden Berechnung. Der Test basiert auf dem Gesetz nach Hagen und Poiseuille (siehe Gleichung 3). Die Volumenflussrate (\dot{V}) berechnet sich aus dem Volumen (V), dass während einer bestimmten Zeit (t) durch eine zylindrische Röhre fließt. Die Volumenflussrate ist abhängig vom Innenradius (r) der Röhre, der eingesetzten Druckdifferenz (Δp) zwischen den Röhrenenden, der Viskosität (η) der fließenden Flüssigkeit und der Gesamtlänge (L) der Röhre.

In der Prüfung wird bidestilliertes Wasser eingesetzt, welches bei dem oft benutzten Injektionsdruck von 50 mbar in die Kapillare gedrückt und im Auslass aufgefangen wird. Der Ofenraum wird auf 20°C temperiert, so dass die Viskosität von Wasser 1,008 mPas beträgt [55]. Für eine Kapillare mit der Gesamtlänge von 0,6 m und mit 100 Injektionen von Wasser bei 50 mbar für 1 min sollte die Injektionsmenge 7,7 mg $\pm 25\%$ betragen. Die Verdunstung von Wasser während der Prüfung kann anhand der zwei zusätzlichen Vials, die ebenfalls in den Probenhalter gestellt wurden, berücksichtigt werden.

Die Linearität der Injektion wird ähnlich durchgeführt wie die Prüfung auf Detektorlinearität, jedoch wird nur eine Probe mit unterschiedlichen Drücken und Zeiten injiziert. Das Produkt aus Druck und Zeit verhält sich proportional zur Peakfläche. Gemäß der Prüfung auf Detektorlinearität wird für diesen Test eine lineare Regression und das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Das Akzeptanzkriterium ist ebenfalls $R^2 \geq 0,99$ (vergleiche Abbildung 4-11, Kapitel 4.2.3 und Referenz [132]). Auch hier werden für die OQ 8 x 3 Messungen durchgeführt, in der PQ sind dann nur noch 3 x 2 nötig, um die Linearität zu reevaluieren. Die Ergebnisse der PQ und der letzten OQ werden gemeinsam auf Linearität geprüft. Wenn diese Prüfung gegen das Akzeptanzkriterium von $R^2 \geq 0,99$ fehlschlägt, müssen 8 x 3

Messungen für die Berechnung der Linearität neu durchgeführt werden. Obwohl die Prüfungen für Detektor- und Injektionslinearität fast identisch in ihrer Herangehensweise sind, können die Tests nicht zusammen durchgeführt werden. Es werden unterschiedliche Module qualifiziert, die voneinander abhängen. Ohne einzelne Prüfungen kann bei Nichtbestehen die Fehlerquelle nicht explizit genannt werden, bzw. bei Nichtbestehen eines gemeinsamen Tests schließt sich eine weitere Fehlersuche an.

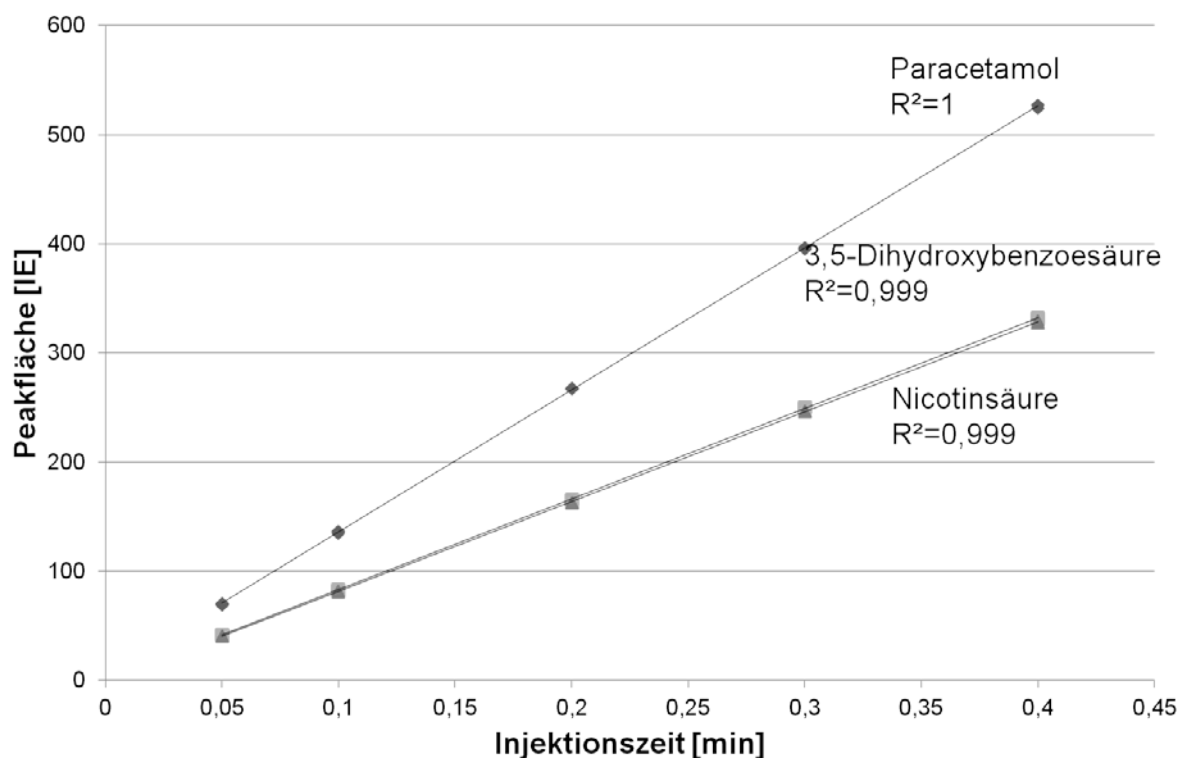


Abbildung 4-11: Prüfung auf Linearität. Das Produkt aus Injektionszeit und –druck wurde nur auf die Injektionszeit umgerechnet.

Der Abschlusstest beinhaltet die Injektionspräzision, für die sechs Trennungen der Standardmethode (Kapitel 8.4.3.1) durchgeführt werden. Jeder andere Parameter wirkt sich auf das Ergebnis dieses Testes aus, wie z.B. die Spannungsstabilität oder die Wellenlängenrichtigkeit. Sowohl Migrationszeit, als auch Peakfläche werden auf ihre Präzision beurteilt, um den Einfluss schwankender Migrationszeiten auf die Peakfläche zu kontrollieren. Als Akzeptanzkriterium für die RSD% von korrigierten Peakflächen wird in Referenz [132] ein Wert von 3% vorgeschlagen. In der HPLC wird der korrespondierende Wert für die Präzision der Peakfläche mit 1% wesentlich enger gesetzt [131]. Dieses strenge Akzeptanzkriterium wird auch für die hohe Produktqualität, welche die Techniken evaluieren sollen, als notwendig erachtet. Das Europäische Arzneibuch fordert für die meisten seiner monographierten Substanzen einen Gehalt von 95-105%, daher benötigen analytische Methoden für die Gehaltsbestimmung eine Präzision von mindestens 2% [138]. Mit den modernen CE-Systemen, die zur Verfügung stehen, ist ein Akzeptanzkriterium unter 3% technisch möglich. Dieses sollte dementsprechend auch gewählt werden. Deswegen werden

zwei Akzeptanzkriterien festgelegt, 1,5% für die Präzision der Migrationszeit, 2% für die Präzision der Peakflächen.

Die getrennte Auswertung von Migrationszeit und Peakfläche führt auch zu einer höheren Aussagekraft als die alleinige Auswertung der korrigierten Peakfläche. Migrationszeit und Peakfläche geben zusätzliche Informationen über die Parameter, von denen sie abhängen. Deswegen können beide als Anhaltspunkte für die gesamte Funktionsfähigkeit dienen. Dies gilt natürlich auch für alle eindeutig definierten Methoden, die hier vorgestellte Standardmethode ist nur eine Möglichkeit. In den meisten Fällen sind Daten aus Routineanalysen ebenfalls tauglich, um Migrationszeit und Peakfläche als Indikatoren für die Funktionalität des CE-Systems zu verwenden. So erhält man eine wesentlich höhere Datenzahl für die Auswertung und dadurch eine gute statistische Power.

4.2.5 Ergebnisse der Qualifizierung

Alle vorhandene CE-Instrumente (Tabelle 8-1) wurden während der Ausarbeitung der Qualifizierungsmethoden auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft und qualifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Für einige Parameter sind Spannweiten angegeben, da hierfür Elektropherogramme mit den drei Substanzen Paracetamol, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure ausgewertet wurden. Bei den zuerst getesteten Instrumenten wurden nicht alle Parameter abgeprüft, die letztendlich in der OQ zu finden sind. Die ersten Entwürfe, die mit dem UniCAM Crystal 310 CE System 1 getestet wurden, beinhalteten die wichtigsten Parameter für eine Qualifizierung (siehe auch Kapitel 4.4).

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Qualifizierung aller eingesetzten CE-Instrumente

	Akzeptanzkriterium	UniCAM Crystal 310 CE System 1	UniCAM Crystal 310 CE System 2	PrinCE 550 CE	HP3D CE System	Agilent CE 1600 System
Temperatur	Stabilität	±0,04°C	±0,05°C	±0,05°C	±0,01°C	±0,05°C
	Richtigkeit			+1,1°C		+2,8°C
	Kühlsystem			2,4 W/m		3,4 W/m
Spannung	Stabilität	±0,19%	±0,18%	0,11%	0,06%	±0,04%
	Richtigkeit			0,71%		Referenz
Detektor	Rauschen	0,96*10 ⁻⁵ AU	5,34*10 ⁻⁵ AU	3,4*10 ⁻⁵ AU		4,1*10 ⁻⁵ AU
	Wellenlängenrichtigkeit	±1,8 nm		±1,8 nm	±1,9 nm	±1,4 nm
Injektion	Linearität	0,992-0,999		0,994-0,999		0,998
	Richtigkeit			18,5%		>25%
	Linearität	0,9999-1		0,997-0,998		0,987-0,995
Präzision	Migrationszeit: RSD<1,5%	1,13-1,22%	1,71-3,22%	0,94-1,13%	0,09- 0,14%	0,21-0,27%
	Peakfläche: RSD<2%	0,36-0,93%	3,02-3,98%	1,13-1,29%	0,84- 1,30%	1,85-2,5%

Für die Kapillarelektrophorese-Systeme UniCAM Crystal 310 CE System 2 und HP3D CE System wurden bereits bestehende Daten genutzt, um die Funktionsfähigkeit zu überprüfen. Zum Zeitpunkt der Prüfung zeigten bereits beide Instrumente Ausfälle und Unregelmäßigkeiten. Im Fall des UniCAM-Instrumentes war anhand der vorliegenden Daten gut zu sehen, dass die Injektion fehlerhaft war. Es stellte sich heraus, dass das Drucksystem nicht einwandfrei funktionierte und repariert werden musste. In den Daten des HP3D CE Systems war kein Fehler zu erkennen. Allerdings brach das Instrument regelmäßig Sequenzen ab. Die Überprüfung interner Sensoren ergab, dass ebenfalls ein Fehler am Drucksystem vorlag. Dieser Fehler wirkte sich aber nicht auf die Präzision des Instrumentes aus, sondern nur auf die allgemeine Funktionsfähigkeit des Instrumentes. Eine Reparatur war auch hier nötig. Beide Instrumente sind seitdem außer Betrieb, so dass die fällige Requalifizierung nach einer Reparatur noch nicht durchgeführt wurde.

Das älteste CE-Instrument in Betrieb ist das UniCAM Crystal 310 CE System 1 mit über 20 Dienstjahren. Die Überprüfung der wichtigsten Parameter ergab, dass ein gut gewartetes Instrument auch nach so langer Zeit leistungsfähig ist und zuverlässige Daten produziert. Die Qualifizierung wurde ohne Beanstandung bestanden. Besonders die Spitzenwerte für die Injektionslinearität von $R^2 = 0,9999 - 1$ und für die Peakflächenpräzision von $0,36 - 0,93\%$ müssen für diese doch schon recht alte Kapillarelektrophoreseapparatur hervorgehoben werden.

Die zwei jüngsten Instrumente, die qualifiziert wurden, die PrinCE 550 CE und die Agilent 1600 CE sind ca. 5 bzw. 4 Jahre in Betrieb. Beide Instrumente wurden der vollständigen Qualifizierungsanweisung unterzogen. Allerdings ist zu beachten, dass für die Prüfung auf Spannungsrichtigkeit die Agilent 1600 CE als Referenz diente und somit kein Wert für die Prüfung in der Tabelle 4-3 zu finden ist. Die PrinCE 550 CE bestand alle Prüfungen und liefert zuverlässige Daten in der Routine. Im Gegensatz dazu gab es bei der Agilent 1600 CE insgesamt vier nicht bestandene Prüfung. Zum einen wird die Temperatur nicht richtig eingestellt. Dieses Ergebnis und seine Auswirkungen wurden bereits in Kapitel 3.7 ausführlich diskutiert. Deutlich schwerwiegender ist die fehlerhafte Injektion. Alle Prüfungen, also Richtigkeit, Linearität und Präzision der Peakflächen, liegen gerade außerhalb der Akzeptanzkriterien. Nach der Qualifizierung muss eine Reparatur veranlasst werden. Für dieses Instrument und seine weitere Nutzung wurde allerdings auf eine Reparatur verzichtet. Mit dem Wissen um die fehlerhafte Injektion wurden alle weiteren Analysen auf diesem Gerät mit einem internen Standard durchgeführt. Dieser hebt den Injektionsfehler größtenteils auf (siehe Kapitel 2.6).

Die Praxisbeispiele zeigen, dass mit den erarbeiteten Methoden aus Tabelle 4-1 und den dazugehörigen Akzeptanzkriterien Kapillarelektrophorese-Systeme auf ihre Funktions- und Leistungsfähigkeit überprüft werden können. Gut gewartete Instrumente, selbst wenn sie bereits älter sind, können innerhalb der Grenzen bleiben, treten jedoch Fehler auf, so werden diese anhand der Methoden und ihrer Grenzwerte erkannt.

4.3 Holistische Qualifizierung

Der Zeitaufwand für die Qualifizierung eines Instrumentes ist ein wichtiger Faktor, damit ein Qualifizierungskonzept anerkannt wird. Wenn jeder vorgestellte Parameter individuell getestet wird, dauert auch eine gut vorbereitete OQ circa 1,5-2 Tage. Abbildung 4-12 zeigt für HPLC-Anlagen einen ähnlichen Zeitaufwand, der aber auch in bis zu 30% der Fälle wesentlich länger ausfallen kann. In dieser Zeit steht das Instrument nicht zur Verfügung und kann nicht für seine eigentlichen Aufgaben, wie z.B. die Qualitätskontrolle, eingesetzt werden. Um den Nutzungsausfall möglichst gering zu halten, wird eine holistische Herangehensweise für die PQ vorgestellt, in der verschiedene Parameter in einem Test zusammengefasst werden.

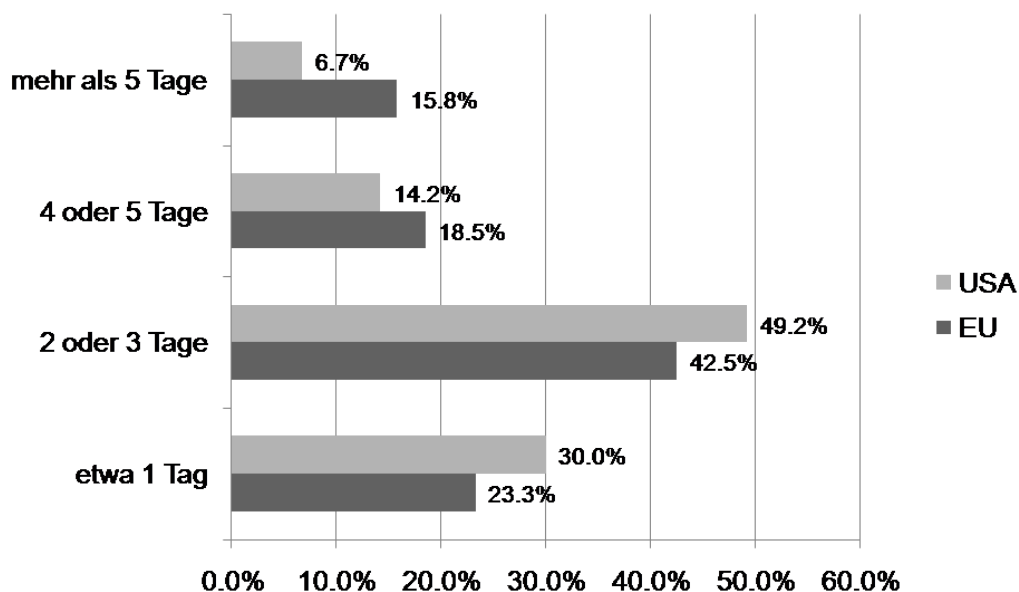


Abbildung 4-12: Umfrage unter HPLC-Nutzern zur Frage: „Wie lange ist für gewöhnlich der Nutzungsausfall einer HPLC-Anlage zwischen der Außer- und der Inbetriebnahme bei einer Qualifizierung“ [129, 139]

Während einer Trennung ohne Injektion können gleichzeitig Temperaturstabilität, Temperaturrichtigkeit, Spannungsstabilität und Detektorrauschen ausgewertet werden. Injektionslinearität und –präzision können ebenfalls gemeinsam getestet werden, wenn eine Injektionskonfiguration des Linearitätstestes auch für den Präzisionstest genutzt wird. Dann werden drei Messungen von der Prüfung auf Linearität und drei zusätzliche Messungen mit

derselben Konfiguration als Prüfung auf Injektionspräzision ausgewertet. Desweiteren kann die Wellenlängenrichtigkeit während jedes Testes, der eine Probeninjektion beinhaltet, durchgeführt werden, indem der Diodenarraydetektor während der Trennung Spektren aufnimmt.



Abbildung 4-13: Holistische Qualifizierung

Bei der Zusammenlegung der einzelnen Tests muss berücksichtigt werden, dass die Parameter zwar im Zusammenhang getestet werden, aber jeder Parameter einzeln ausgewertet und in der Reihenfolge von Tabelle 4-1 bewertet wird. Dies ist nötig, um möglichst früh Fehler zu diagnostizieren und den richtigen Modulen zuordnen zu können.

4.4 Informationen aus Systemtauglichkeitstests für die Qualifizierung

Während der Validierung von analytischen Methoden, der zweiten Stufe im Qualitätsmanagement (Abbildung 4-1), werden auch Akzeptanzkriterien für Systemeignungstests und die dazugehörigen Parameter, wie z.B. Auflösung oder Signal-Rausch-Verhältnis, definiert. Der Test sollte das gesamte System von der Ausrüstung über die analytischen Arbeitsabläufe bis zur Probe repräsentieren und die Sicherheit geben, dass das System zum Zeitpunkt des SSTs einen akzeptablen Leistungsstand zeigt [30, 125, 140]. Für gewöhnlich nutzt der SST dieselbe Methode wie die nachfolgende Analyse, indem ein Standard injiziert wird. Zusätzlich zu den geforderten Parametern können auch die Migrationszeit und die Peakfläche wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben ausgewertet werden und zeigen damit die Funktionsfähigkeit von Methoden und selbstverständlich auch vom Instrument an [127].

Viele Parameter der AIQ haben einen Effekt auf die Reproduzierbarkeit von Migrationszeit und Peakflächen. Abbildung 4-14 zeigt diese Effekte. Ein wichtiger Parameter, der sowohl einen Einfluss auf die Migrationszeit als auch auf die Peakflächen hat, ist die Viskosität, die

selbst von der Temperatur und deren Stabilität abhängt (Gleichung 14). Fluktuationen in der Temperatur verursachen unbeständige Geschwindigkeiten der Substanzen und unregelmäßige Injektionsmengen. Die Abhängigkeit der Migrationsgeschwindigkeit und des Volumenstromes während einer hydrodynamischen Injektion von der Viskosität und damit von der Temperatur ist durch Gleichung 3 und Gleichung 6 abgebildet. Insbesondere die Stabilität der Temperatur ist für die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten erforderlich. Außerdem wird die Migration von der Spannungsstabilität beeinflusst, wie auch Gleichung 40 zeigt. Auf die Peakfläche wirken sich neben der Temperaturstabilität noch weitere Parameter aus, wie die Injektionspräzision, das Detektorrauschen und die Wellenlängenrichtigkeit.

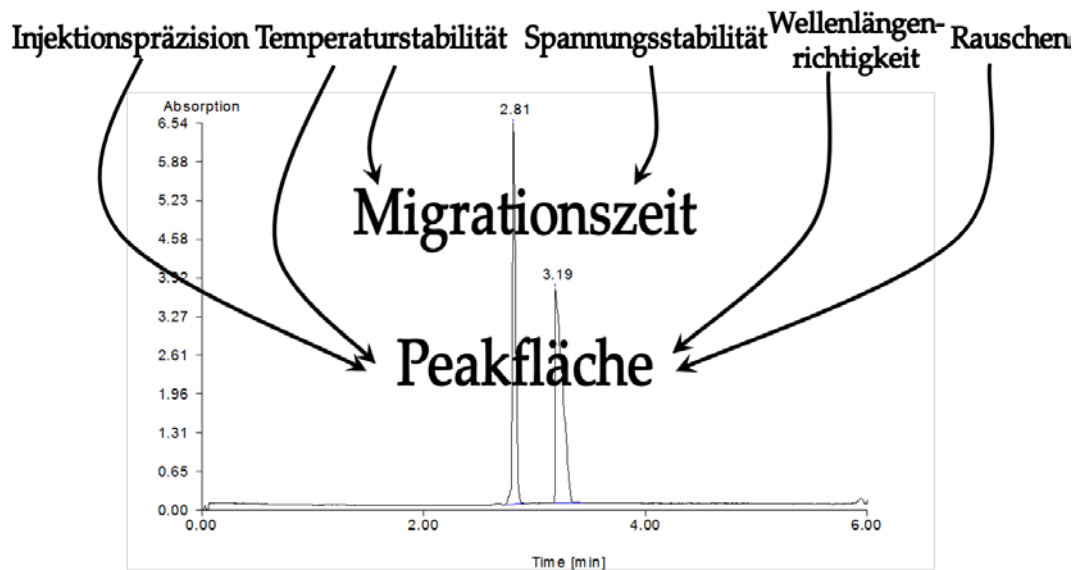


Abbildung 4-14: Zusammenhänge zwischen den Parametern und der Migrationszeit und der Peakfläche

Ein einfaches Werkzeug für die Überwachung von Systemeignungstests ist die Einführung von Kontrollkarten. In denen können neben Peakflächen und Migrationszeit auch weitere Parameter wie z.B. Auflösung oder Signal-Rausch-Verhältnis beobachtet werden. Es entsteht eine langfristige Leistungshistorie eines Instrumentes [131, 141]. Systemeignungstests können weitere zusätzliche Informationen für die AIQ liefern, da viele der Parameter, die in der AIQ beschrieben sind, eben einen Einfluss auf die Parameter des SSTs haben. Wenn ein SST bestätigt, dass ein System aus Instrument und Methode tauglich ist, sollten auch alle Instrumentenparameter in ihren Grenzen liegen.

Die kontinuierliche Leistungsqualifizierung (cPQ, Engl.: continuous PQ) verfolgt das Konzept, dass mit einem erweiterten Systemeignungstest bereits eine nahezu vollständige PQ durchgeführt wird. Abbildung 4-15 zeigt, welche Parameter während des erweiterten Systemeignungstests, also während der cPQ abgeprüft, werden können. In der Risikoanalyse der Referenz [133] werden die möglichen Fehler nach ihrer der

Wahrscheinlichkeit des Auftretens, dem Schweregrad des Schadens und der Schwierigkeit den Fehler zu entdecken bewertet. Dies führt dazu, dass Fehler die höchste Priorität erhalten, die durch grobe Anwendungsfehler (z.B. Kapillare falsch eingebaut) oder durch schwerwiegende Systemfehler (z.B. Detektorausfall) entstehen. Diese werden durch die Nutzung von Systemeignungstests entdeckt, da sie meist zu leeren Elektropherogrammen oder Abbruch einer Sequenz führen. Das eigentliche Ziel einer Qualifizierung in der täglichen Routine ist neben der Funktionsfähigkeit auch die Leistungsfähigkeit eines Instrumentes zu bestätigen. Bei dieser Fragestellung rücken die Parameter in Vordergrund, die die Leistung eines Instrumentes spezifizieren. In der Kapillarelektrophorese sind das die Stabilität von Temperatur und Spannung, das Rauschen und Wellenlängenrichtigkeit des Detektors, sowie die Präzision der Injektion.

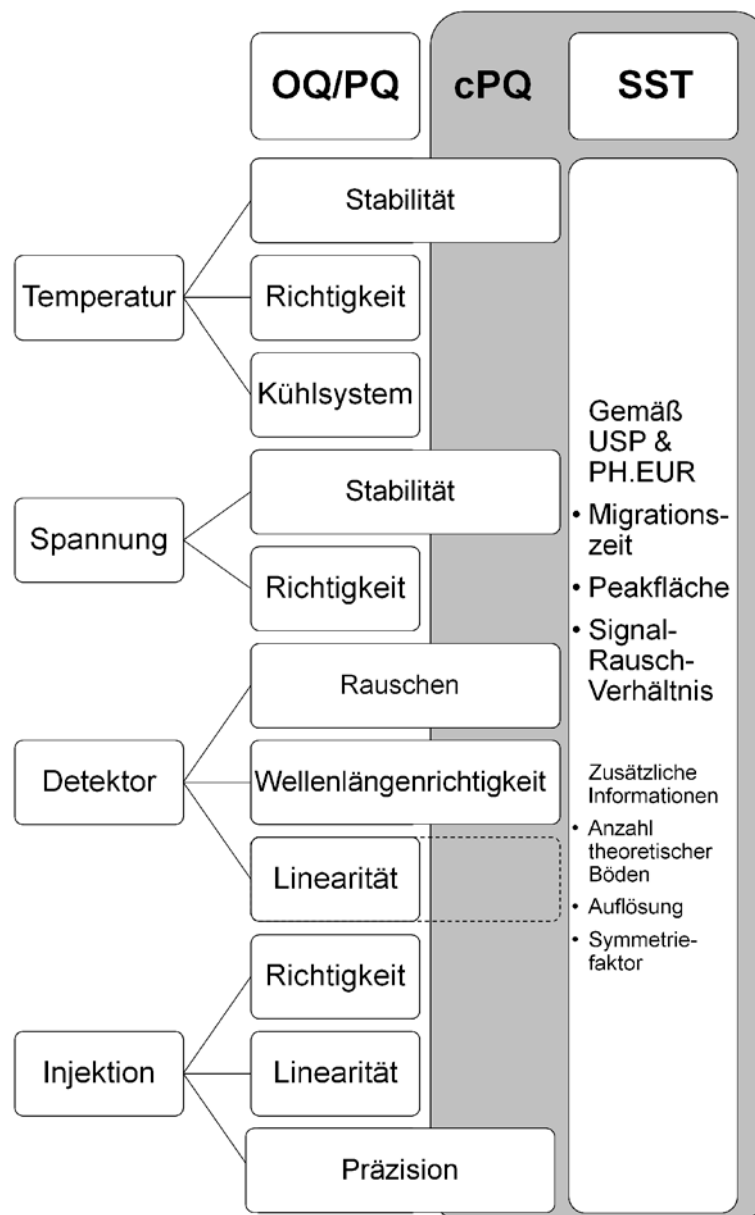


Abbildung 4-15: Das Konzept der kontinuierlichen Leistungsqualifizierung

Deswegen müssen während der Entwicklung der Methode und des SSTs alle Aspekte der guten Arbeitspraxis für die Kapillarelektrophorese eingesetzt werden [49]. Somit sind Informationen über den Status der CE jederzeit verfügbar und sowohl die Frequenz als auch der Aufwand für die regelmäßigen PQ kann auf ein Minimum reduziert werden. Dieses Minimum liegt bei einer jährlichen Qualifizierung eines Instrumentes [127].

Die cPQ lässt sich mit wenig Aufwand in die tägliche Routine einbauen. Zusätzlich zu den geforderten SSTs des Arzneibuchs und/oder der Standardarbeitsanweisung sollten mindestens eine Trennung ohne Probeninjektion und sechs Trennungen mit Injektion einer Standardprobe eingebunden werden, die gleichmäßig über den gesamten Analysenzyklus verteilt sind. Mit diesen zusätzlichen Prüfungen werden die Parameter Temperaturstabilität, Spannungsstabilität, Detektorrauschen (alle während der Trennung ohne Injektion) und Injektionspräzision (sechs Trennungen mit Standard) abgedeckt. Wenn während der nachfolgenden Analyse eine Kalibrierung benötigt wird, kann diese auch für die Prüfung auf Detektorlinearität genutzt werden. Diese Parameter werden als kritisch eingestuft, da sie einen direkten Einfluss auf die Richtigkeit von Analysen haben, deswegen ist es von Vorteil sie mit den täglichen SSTs zu prüfen [133]. Wenn eine neue SOP für eine Methode erarbeitet wird, so können die Empfehlungen dieses Konzeptes mit eingearbeitet werden. Aber auch in bereits bestehende SOPs lässt sich das Konzept der cPQ ohne Aufwand einbinden. Die Prüfungen auf Richtigkeit der Temperatur, Spannung und Injektion benötigen zusätzliche Tests, aber da diese Parameter weniger kritisch sind, können sie halbjährlich mit der geforderten regelmäßigen PQ getestet werden.

Mit dem Konzept der kontinuierlichen PQ gewinnt man die Übersicht über die relevanten Parameter. Heutzutage kann die cPQ die regelmäßige Durchführung einer vollständigen PQ, die von den Regulierungsbehörden gefordert wird, noch nicht vollständig ablösen. Aber sie gibt zusätzliche Informationen und die Gewissheit, dass dauerhaft zuverlässige Daten erzeugt werden. Wenn für die cPQ Kontrollkarten angelegt werden, kann die komplette Historie der Leistung eines analytischen Instrumentes verfolgt werden. Trends in der Leistung werden rechtzeitig sichtbar und Gegenmaßnahmen können frühzeitig durchgeführt werden, bevor sich ein Ausfall oder eine notwendige Reparaturen abzeichnen.

4.5 Fazit

Ein AIQ-Konzept wurde erarbeitet, dass sowohl die Kosten im Blick hat, als auch einen holistischen Ansatz nutzt. Die Anforderungen der wichtigsten Arzneibücher, dem USP und dem Europäischen Arzneibuch, wurden mit eingearbeitet [30, 32, 140]. Mit diesem Konzept

ist die Basis gelegt, um zuverlässige Daten im Sinne des Dreiecks der Datenqualität zu erzeugen (siehe Abbildung 4-1 und Referenz [123]).

Für jedes der vier Module eines CE-Systems wurden Parameter definiert, Testmethoden entwickelt und Akzeptanzkriterien formuliert. Die benötigte direkte Messung der Temperatur konnte bereits in Kapitel 3 etabliert werden und wurde für die AIQ wieder aufgegriffen. Zur Überprüfung des Kühlungssystems wurde ein Funktionstest entwickelt. Ebenso wurde eine indirekte Methode zur Bestimmung der Richtigkeit der Spannung entwickelt, die über die effektiven Mobilitäten beurteilt werden kann. Die Qualifizierung von Detektor und Injektionssystem wird angelehnt an die Qualifizierung dieser Module in der HPLC durchgeführt. Desweiteren wurden die entwickelten Methoden in einem holistischen Ansatz zusammengefasst. Dies und die Vorstellung der kontinuierlichen Leistungsqualifizierung führen zu einer Minimierung der Kosten und der Ausfallzeiten von Kapillarelektrophorese-Systemen. Das Konzept zur cPQ nutzt einen erweiterten Systemeignungstest, so dass regelmäßig eine fast vollständige Qualifizierung eines Systems stattfindet.

Die AIQ ist somit ein unverzichtbares Werkzeug der täglichen Laborarbeit in allen Zweigen der Industrie und der Forschung, die auf Qualität achten und diese benötigen. Mit dem beschriebenen Konzept wurde eine ausgearbeitete AIQ für die Kapillarelektrophorese zur sofortigen Nutzung bereitgestellt.

5 Kapillarisoelektrische Fokussierung

In der Proteom-Forschung wird die Zusammensetzung von Proteinspezies einzelner Organismen oder Teilen davon untersucht [33]. Besonders im Hinblick auf die Suche nach potentiellen Biomarkern ist die Veränderung der Zusammensetzung von Interesse. Biomarker sind Indikatoren für Gesundheit und Krankheit, von Zucker im Urin als Zeichen für Diabetes bis hin zu Mutationen im EGF-Rezeptor (EGFR, Engl.: epidermal growth factor receptor), an dem das Ansprechen einer Therapie bei Lungenkrebs vorhergesagt werden kann [142]. Die Hauptaufgaben von Biomarkern sind die Diagnose, die Vorhersage von Heilungschancen und Therapieverläufen, sowie die Aussage über Prävention und Therapie. Die Suche nach geeigneten Proteinen ist ursprünglich das Gebiet der 2D-Gelelektrophorese. Allerdings werden verschiedene Techniken, wie die Flüssigchromatographie und die Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie gemeinsam genutzt, um ein ähnliches Auflösungsvermögen bei gleichzeitiger Reduktion des Arbeits- und Zeitaufwands zu erhalten [33].

Für die Anwendung der kapillarisoelektrischen Fokussierung in der Proteom-Forschung ist insbesondere die Kupplung mit der Massenspektrometrie von Interesse. In der Kombination beider Techniken erhält man die gleichen Informationen wie aus einer 2D-Gelelektrophorese, die sich aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE (Massenauftrennung) zusammensetzt. Man erhofft sich aus dieser Kombination eine höhere Auflösung als in der 2D-Gelelektrophorese, die zurzeit ca. 10000 Proteinspezies trennen kann [33].

Für die Anwendung der CIEF in Kombination mit der Massenspektrometrie in der Proteom-Forschung sollte man den genutzten Gradienten gut kennen. In einem zweiten Schritt kann dann die Methode der Probe angepasst und diese charakterisiert werden. Die eingesetzten IEP-Marker können einerseits zur Charakterisierung von Probe und Gradient als auch zur besseren Quantifizierung als interne Standards benutzt werden.

5.1 Aktueller Stand

Methoden aus der Literatur unterscheiden sich in der Nutzung von Beschichtungen, Zusätzen und dem Einsatz von IEP-Markern [82]. Auf Beschichtungen wird in Kapitel 2.1.2.1 eingegangen. Als Zusätze werden gerne sogenannte „Solubilizers“ eingesetzt, also Substanzen, die Proteine in Lösung halten. Geeignet sind unter anderem Glycerol zur Stabilisierung hydrophober Proteine [143] und Harnstoff, das durch Einschluss die

Ausfällung der Proteine verhindert [144]. Generell ist die Anwesenheit von Salzen, wie z.B. Natriumchlorid oder Puffersubstanzen in Probe oder Elektrolytlösung nachteilig für die Trennung [82].

5.1.1 Präzision von Peakflächen und Migrationszeiten

Shimura untersuchte in seinem Review von 2009 [82] 14 Artikel mit Daten zur Präzision von Peakflächen und Migrationszeiten. Allen Datensätzen ist gemein, dass die Präzision jeweils nur über eine kleine Anzahl von Läufen (<10) berechnet wurde. Die Migrationszeiten zeigen in der Regel Präzisionen als relative Standardabweichung berechnet von kleiner 2%. Die RSD-Werte für die Peakflächen variierten von 6-28%. Suratman et al. zeigten für lange Serien (130 Trennungen), dass RSD-Werte unter 10% für Migrationszeit und Peakflächen erreicht werden können [41]. Allerdings sieht man gerade an der Langzeituntersuchung, wie schwierig es ist trotz optimierter Spülprozeduren reproduzierbare Daten zu erhalten.

5.2 Marker für isoelektrische Punkte

Als Marker für den isoelektrischen Punkt können verschiedene Substanzen eingesetzt werden, z.B. Proteine wie in der Gelelektrophorese. In der Kapillarelektrophorese allerdings besitzen Proteine als IEP-Marker verschiedene Nachteile. Die geringe Löslichkeit an ihrem isoelektrischen Punkt kann zur Fällung führen. Desweiteren muss man Instabilitäten bei der Lagerung und die Löslichkeit in Wasser berücksichtigen. Da Proteine außerdem noch an der Kapillarwand adsorbieren können, ist es besser auf Proteine als IEP-Marker zu verzichten. Bewährt haben sich substituierte Aminomethylphenole [80, 145–147], sowie Peptide, die entweder Tryptophan enthalten [148] oder fluoreszenzmarkiert sind [149].

Bei der Bestimmung von isoelektrischen Punkten muss allerdings beachtet werden, dass experimentelle Parameter einen Einfluss haben. Neben der Temperatur sind hier besonders die Zusätze wie Glycerol und Harnstoff zu erwähnen (siehe Kapitel 5.1 und Referenz [78]). Einerseits verhindern sie, dass die Proteine ausfallen und so die Trennung und Reproduzierbarkeit verschlechtern. Andererseits verändern sie durch An- und Einlagerung die Oberflächeneigenschaften der Proteine und somit auch deren IEP.

5.2.1 Substituierte Aminomethylphenole

Die substituierten Aminomethylphenole können als isoelektrische Punktmarker verschiedene Aufgaben in der isoelektrischen Fokussierung übernehmen. Neben der Bestimmung von IEPs von bekannten und unbekannten Proteinen können sie ebenfalls als interner Standard

zur Quantifizierung eingesetzt werden. Außerdem kann mit einer Mischung aus Markern in derselben Trennung der pH-Gradient charakterisiert werden. In Tabelle 8-5 sind alle eingesetzten Marker mit IEP, Molekülmasse und Strukturformel aufgeführt. Diese absorbieren bei der üblicherweise in CIEF genutzten Wellenlänge von 280 nm [146]. Abbildung 5-1 zeigt die Trennung aller eingesetzter IEP-Marker mit der in Kapitel 8.5 beschriebenen Methode.

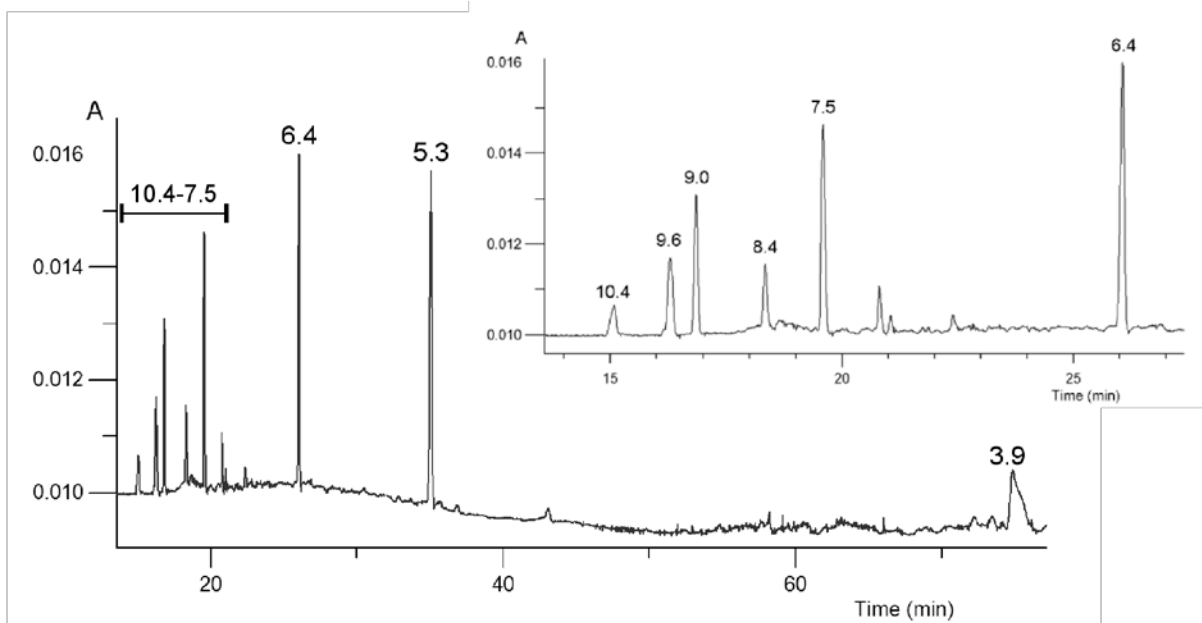


Abbildung 5-1: Trennung von acht IEP-Markern, jeweils in einer Konzentration von 6 µl/ml. Oben rechts ist die Trennung bis zur 30. Minute vergrößert dargestellt.

Im Gegensatz zu Proteinen, aber auch zu Peptiden sind die Aminomethylphenole eindeutig charakterisierte Substanzen, die keine Heterogenität aufweisen [150]. Weitere Vorteile sind ihre Stabilität, Reinheit und Löslichkeit in Wasser. Außerdem lassen sie sich gut UV-metrisch vermessen. Gute Ampholyte sollten einen $[-dz/d(pH)]_{pI}$ -Wert $>0,045$ besitzen; dieser Wert beschreibt die Abhängigkeit der effektiven Ladung auf den pH am isoelektrischen Punkt [145]. Alle genutzten IEP-Marker liegen über diesem Grenzwert [145, 146].

5.2.2 Interner Standard

Die acht IEP-Marker wurden einerseits in ihrer eigentlichen Funktion als Marker, aber andererseits auch als interne Standards eingesetzt. Die Daten aller Trennungen, die während der Arbeiten auch zur Untersuchung der Cohn-Fraktion durchgeführt wurden, wurden gemeinsam ausgewertet. Die relativen Standardabweichungen wurden nach Gleichung 41 zusammengefasst [131]. Dies erhöht die Anzahl der Freiheitsgrade und damit die Aussagekraft in die statistische Auswertung.

$$\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n f_i \cdot \hat{\sigma}_i^2}{\sum_{i=1}^n f_i}$$

$$\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2 \quad \text{Gesamtvarianz}$$

$$\hat{\sigma}_i^2 \quad \text{Varianz der Serie } i$$

Gleichung 41: Zusammenfassung von Standardabweichungen

In Tabelle 5-1 werden die relativen Standardabweichungen für alle eingesetzten IEP-Marker dargestellt. Die Migrationszeiten zeigen ohne Standardisierung bereits gute RSD-Werte zwischen 2-4%. Für die Peakflächen verhält es sich sehr unterschiedlich. Der IEP-Marker 6,4 hat ein Signal-Rauschverhältnis von über 400. Im Elektropherogramm (Abbildung 5-1) ist zusätzlich zu erkennen, dass der Peak dieses Markers eine symmetrische Form besitzt. Die zusammengefassten RSD-Werte liegen somit auch für eine große Anzahl an Trennungen unter 5%. Das Gegenbeispiel dazu ist der IEP-Marker 3,9. Dieser wird erst nach 70 min im Elektropherogramm sichtbar und ist sichtlich verbreitet. In der Umgebung des Peaks ist der Anteil des Rauschens an der Basislinie sehr hoch, so dass es schwierig ist, diesen Peak zu integrieren. Dies macht sich auch im RSD-Wert für die Peakflächen von 66% bemerkbar. Alle weiteren RSD-Werte liegen im Bereich 5-15% und damit in dem Bereich, der in der Literatur angegeben wird (siehe dazu auch Kapitel 5.1.1).

Der IEP-Marker 6,4 wurde ausgesucht, um seine Eigenschaften als interner Standard im Detail zu bewerten. Sowohl Migrationszeiten als auch Peakflächen wurden für jedes einzelne Elektropherogramm auf den Wert des IEP-Markers 6,4 mittels Gleichung 42 und der Gleichung 43 bezogen. MTR ist hierbei das Migrationszeitenverhältnis (Engl.: migration time ratio), PAR das Peakflächenverhältnis (Engl.: peak area ratio), t die Migrationszeit und A die Peakfläche.

$$MTR = \frac{t_{\text{Probe}}}{t_{\text{Interner Standard}}}$$

Gleichung 42: Berechnung des Migrationsverhältnisses MTR

$$PAR = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Interner Standard}}}$$

$$A \quad \text{Peakfläche [IE]}$$

Gleichung 43: Berechnung des Peakflächenverhältnisses PAR

Tabelle 5-1: Auswertung der zusammengefassten, relativen Standardabweichung von Migrationszeit und Peakfläche

IEP-Marker	Anzahl der Trennungen (Freiheitsgrade)	Relative			Nach Standardisierung			Signal-Rausch-verhältnis
		Standardabweichung [%]			Anzahl der Trennungen (Freiheitsgrade)	Relative Standardabweichung [%]		
		Migrationszeit	Peakfläche	Migrationszeit		Peakfläche		
3,9	40 (36)	2,390	66,39	40 (36)	2,351	58.02	92.55	
5,3	97 (79)	2,596	8,931	91 (75)	0.871	4.14	414.7	
6,4	112 (93)	2,702	4,766	105 (88)	Interner Standard		419,9	
7,5	52 (43)	2,305	8,161	45 (38)	0.353	3.593	323.0	
8,5	42 (32)	2,266	10,65	35 (29)	1.338	10.06	107.0	
9	90 (76)	4,025	15,70	90 (76)	1.554	15.47	226.6	
9,6	34 (30)	2,696	5,007	34 (30)	0.554	3.350	120.6	
10,4	24 (21)	3,111	7,759	24 (21)	0.482	6.597	40.38	

Der rechte Teil der Tabelle 5-1 präsentiert die relativen Standardabweichungen nach Standardisierung mit dem IEP-Marker 6,4. Nur Elektropherogramme mit dem Marker 6,4 und mindestens einem weiteren Marker konnten für die Standardisierung genutzt werden, deswegen ist teilweise die Anzahl der Trennungen im rechten Teil der Tabelle 5-1 geringer. Dieser verliert durch die Standardisierung zwar jegliche Information über seine eigene Auswertung, aber die RSD-Werte verbessern sich durchweg. Auf die Migrationszeiten hat der IS großen Einfluss. Diese werden meist auf Werte unter 1,5% verbessert. Der Interne Standard wirkt sich bei der Auswertung der Peakflächen besonders auf die benachbarten Peaks aus und verbessert ihre Werte auf 3,6 und 4,1%. Vergleicht man alle weiteren Experimente, so werden die RSD-Werte der Migrationszeiten in 94% und die der Peakflächen in 66% aller Fälle durch die Standardisierung verbessert. Bei der Wahl eines internen Standards für die CIEF ist es wichtig darauf zu achten, dass der IS im Elektropherogramm nah an der Probe liegt. Nur so lässt sich der interne Standard optimal nutzen.

5.2.3 Charakterisierung der pH-Gradienten

In Referenz [78] diskutiert Righetti die Bestimmung von isoelektrischen Punkten. Da in den kommerziell erhältlichen Ampholytmischungen mehr saure als basische Ampholyte enthalten sind und die basischen zusätzlich eine geringere Pufferkapazität besitzen, wird typischerweise kein linearer pH-Gradient aufgebaut. Zur Charakterisierung des pH-Gradienten benötigt man dementsprechend mindestens drei Marker. Je mehr Marker eingesetzt werden, desto besser kann der Gradient beschrieben werden. In Abbildung 5-2 sind die pH-Profile der zwei eingesetzten Ampholytmischung dargestellt. Aus einer Serie wurden die Migrationszeiten der IEP-Marker und ihre Konfidenzintervalle gegen ihren isoelektrischen Punkt aufgetragen und mit geraden Linien verbunden. Diese Darstellung zeigt deutlich, dass kein linearer Gradient über den angegebenen pH-Bereich aufgebaut wird. Allerdings wird über einige Bereiche ein annähernd linearer Gradient aufgebaut.

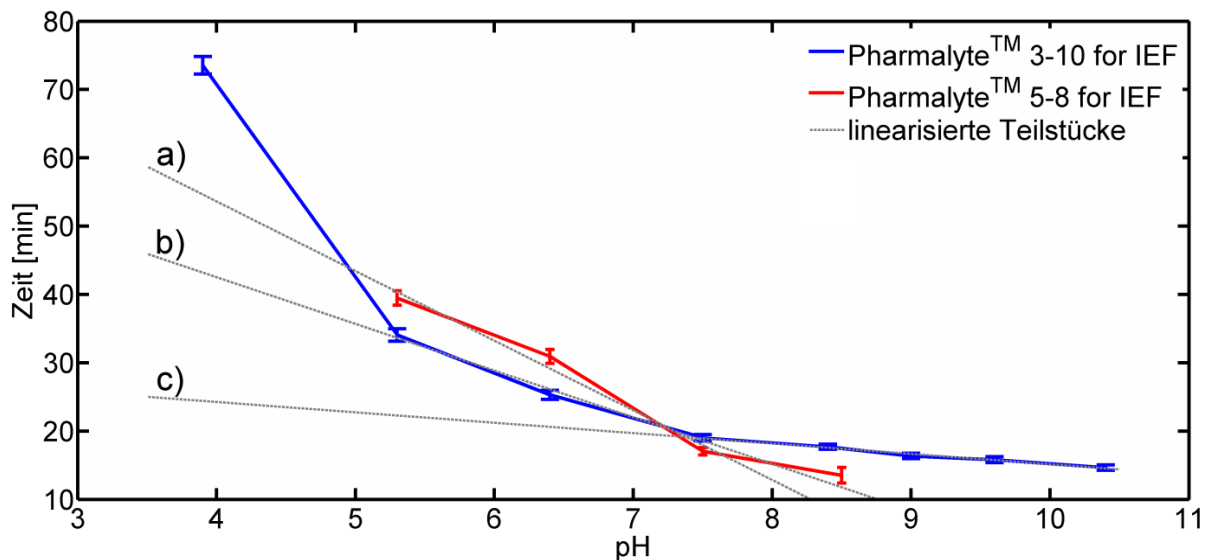


Abbildung 5-2: Charakterisierung der Ampholyte Pharmalyte™ 3-10 und Pharmalyte™ 5-8

Neben den eigentlichen Gradienten sind in Abbildung 5-2 zur Verdeutlichung drei gestrichelte, graue Geraden zu sehen. Diese repräsentieren jeweils eine lineare Regression über Teilstücke der pH-Gradienten. Innerhalb dieser Teilstücke reichen 2 IEP-Marker aus, unbekannte Proben zu charakterisieren und deren isoelektrische Punkte zu bestimmen. Weitere Ergebnisse zu den linearisierten Teilstücken werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

5.2.3.1 Leave-one-out-Experiment

Die isoelektrische Punktbestimmung kann man mit einem sogenannten Leave-one-out-Experiment validieren. Dafür wurden die Daten für Pharmalyte™ 3-10 in Matlab® graphisch dargestellt und ein Shape Preserving Fitting berechnet. Abbildung 5-3 veranschaulicht die Vorgehensweise. In Teil a) wurde das Fitting über alle IEP-Marker berechnet, in Teil b) ohne den IEP-Marker 5,3. Zusätzlich wurde mit der Migrationszeit des Markers ein theoretischer IEP ermittelt. Dieser liegt 0,34 pH-Einheiten vom eigentlichen IEP entfernt.

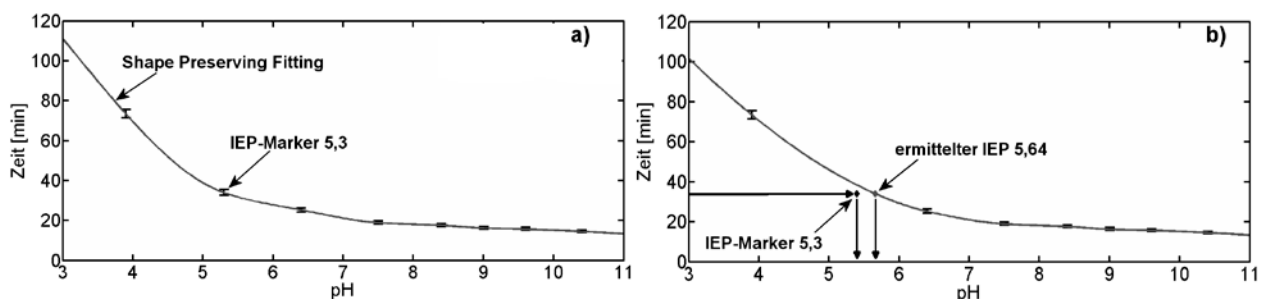


Abbildung 5-3: Leave-one-out-Experiment.

Für alle IEP-Marker, außer dem ersten und letzten, wurde die Migrationszeit aus dem Diagramm herausgenommen und ein Fitting über die verbleibenden Zeiten berechnet. Die Migrationszeit des ausgelassenen IEP-Markers wurde dann genutzt um einen entsprechenden IEP zu berechnen. Tabelle 5-2 vergleicht die Ergebnisse der Validierung mit

den originalen Werten. Das Ergebnis der Validierung ist nicht durchgehend zufriedenstellend, obwohl in der Literatur ebenfalls $\pm 0,5$ pH-Einheiten als Variation angegeben sind [78]. Das Herauslassen von einzelnen Werten führt allerdings zu größeren Abständen zwischen den Markern und ist hier als ungünstigster Fall zu bewerten. In der Praxis können kleinere Differenzen erwartet werden. Variationen in der Migrationszeit machen sich besonders im pH-Bereich größer 7 bemerkbar, da die Kurve dort flacher ist.

Tabelle 5-2: Ergebnisse des Leave-one-out-Experimentes

IEP-Marker	Validierung	Differenz
3,9		
5,3	5,64	0,34
6,4	6,12	-0,28
7,5	8,07	0,57
8,4	8,07	-0,33
9	9,28	0,28
9,6	9,34	-0,26
10,4		

Die linearisierten Teilstücke aus Abbildung 5-2 wurden validiert, in dem die Migrationszeiten der IEP-Marker, die im pH-Bereich der Teilstücke liegen, eingesetzt wurden um entsprechende isoelektrische Punkte zu berechnen.

Tabelle 5-3: Ergebnisse der Validierung der linearisierten Teilstücke

Teilstück a			Teilstück b			Teilstück c		
IEP-Marker	Validierung	Differenz	IEP-Marker	Validierung	Differenz	IEP-Marker	Validierung	Differenz
5,3	5,39	-0,09	5,3	5,24	0,06	7,5	7,46	0,04
6,4	6,22	0,18	6,4	6,52	-0,12	8,4	8,33	0,07
7,5	7,59	-0,09	7,5	7,44	0,06	9	9,21	-0,21
						9,6	9,57	0,03
						10,4	10,33	0,07

Die Differenzen sind hierbei wesentlich kleiner als bei dem Leave-one-out-Experiment. Dies liegt vor allem daran, dass die Bereiche wesentlich kleiner gewählt sind und alle Daten in diesem Bereich einbezogen wurden. Auch hier gilt wieder, dass sich Variationen im pH-

Bereich größer 7 aufgrund der flachen Steigung deutlicher bemerkbar machen (siehe Abbildung 5-2 und Tabelle 5-3).

5.3 Cohn-Fraktion IV-4

Cohn-Fraktionen sind Teilfraktionen der Plasmaproteine, die durch Zugabe von Ethanol bei spezifischen pH-Werten, Ionenstärken, Temperaturen und Proteinkonzentrationen ausfallen [151]. Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde ausgewählt als Beispiel für eine Probe aus der Proteom-Forschung mit einer komplexen Proteinzusammensetzung. Diese Fraktion fällt in 40%igen Ethanol bei einem pH-Wert von 5,8 und einer Temperatur von -5°C aus. Hauptsächlich enthält sie α - und β -Globuline, Ceruloplasmin, Haptoglobulin und Transferrin.

5.3.1 Optimierung der Methode

Um die Cohn-Fraktion IV-4 in der CIEF trennen zu können, mussten einige Anpassungen der Methode aus Kapitel 8.5 vorgenommen werden. Besonders die Löslichkeit der Probe in bidestilliertem Wasser war unzureichend, ein unlöslicher Rest, bestehend aus denaturierten Proteinen, ließ die Lösung opaleszieren. Die Probenvorbereitung wurde in einem ersten Schritt geändert. Tween 20, auch als Polysorbat 20 bekannt, ist ein Polyoxyethylen(20)-sorbitanlaurat und damit ein nicht-ionisches Tensid. Eingesetzt werden kann es als O/W-Emulgator und Lösungsvermittler [55].

In Referenz [86] wurden verschiedene Lösungsvermittler in Hinblick auf ihre Kompatibilität mit MALDI-TOF MS getestet. Eine 1%ige Tween 20-Lösung verbesserte sowohl die Löslichkeit, als auch die Präzision der Migrationszeiten und Peakflächen in der CIEF. In der Untersuchung mit der Massenspektrometrie wurde mit Tween 20 nur eine geringe Ionenunterdrückung beobachtet. Deswegen wurde die gleiche Konzentration an Tween 20 auch in allen weiteren Versuchen eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass der Lösungsvermittler nur in kleinsten Mengen mit der Probe in die Kapillare gelangt und dann weiter zur MS im Online- oder Offline-Modus geleitet wird. In der Untersuchung von Silvertand et al. wurden die Probelösungen einmal in CIEF getrennt und unabhängig davon in der MS vermessen, so dass die Konzentration an Tween 20 in diesem Versuchsaufbau wesentlich größer sein dürften.

Als zweites wurde Glucose der Probenlösung hinzugefügt. Die gewählte Menge von 5 g in 100 ml baut den gleichen osmotischen Druck auf, der im Blut zu finden ist. Die Lösung ist somit isotonisch.

Um einen Überblick über die Verteilung der Cohn-Fraktion IV-4 zu erhalten, wurde zuerst der weitere pH-Gradient Pharmalyte™ 3-10 eingesetzt. In Abbildung 5-4 lassen sich neben den IEP-Markern drei Bereiche der Cohn-Fraktion zu ordnen, ein deutlicher Peak zwischen den Markern 6,4 und 5,3, sowie Spikes und zwei sehr flache Peaks im sauren Bereich (pH<5,3). Zwischen den beiden Markern wurde die Hauptmenge der Fraktion erwartet, da diese bei einem pH-Wert von 5,8 während der Herstellung ausfallen [152]. Die Spikes können auf den schwer löslichen Teil, der mittels von Tween 20 und Glucose in Lösung gehalten wird, zurückgeführt werden [153].

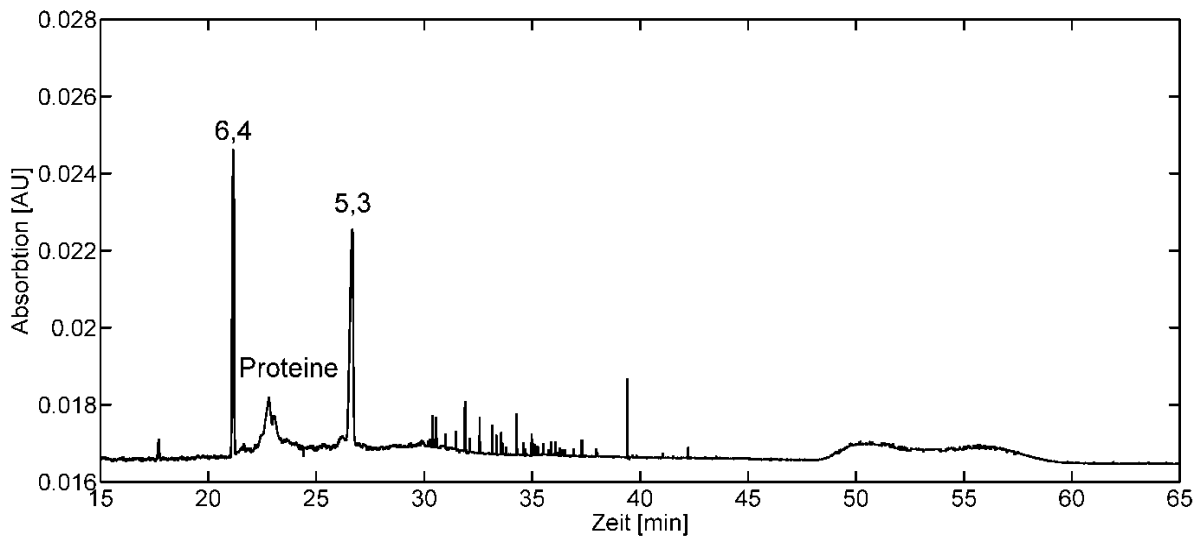


Abbildung 5-4: Trennung der Cohn-Fraktion IV-4 mit Pharmalyte™ 3-10

Im Elektropherogramm a) der Trennung im pH-Bereich 5-8 (Abbildung 5-5) sieht man wieder Proteine im pH-Bereich zwischen 5,3 und 6,4. Der Doppelpeak aus Abbildung 5-4 ließ sich in dem engeren pH-Bereich trennen. Allerdings ist das Signal-Rauschverhältnis klein, sie lassen sich gerade so mit dem Auge erkennen. Aggregate, an den Spikes zu erkennen, und weitere Proteine im sauren Bereich sind ebenfalls wieder zu sehen. Im Elektropherogramm b) der Abbildung 5-5 wurde eine Probe vermessen, die eine Woche in Lösung im Kühlschrank gelagert wurde. Deutlich ist das Verschwinden der Proteine aus dem pH-Bereich 5,3-6,4 und die Vergrößerung der Peaks im sauren Bereich zu sehen. Diese Verschiebung in den sauren Bereich entsteht durch die Deamidierung von Asparagin und Glutamin zu den jeweiligen Säuren. Verschiedene Parameter haben Einfluss auf diesen Prozess, wie z.B. der pH, die Temperatur, die Aminosäuresequenz und die Ordnung der Proteine. Unter physiologische Bedingungen, aber auch während der Probenvorbereitung und Lagerung findet die Deamidierung statt [154].

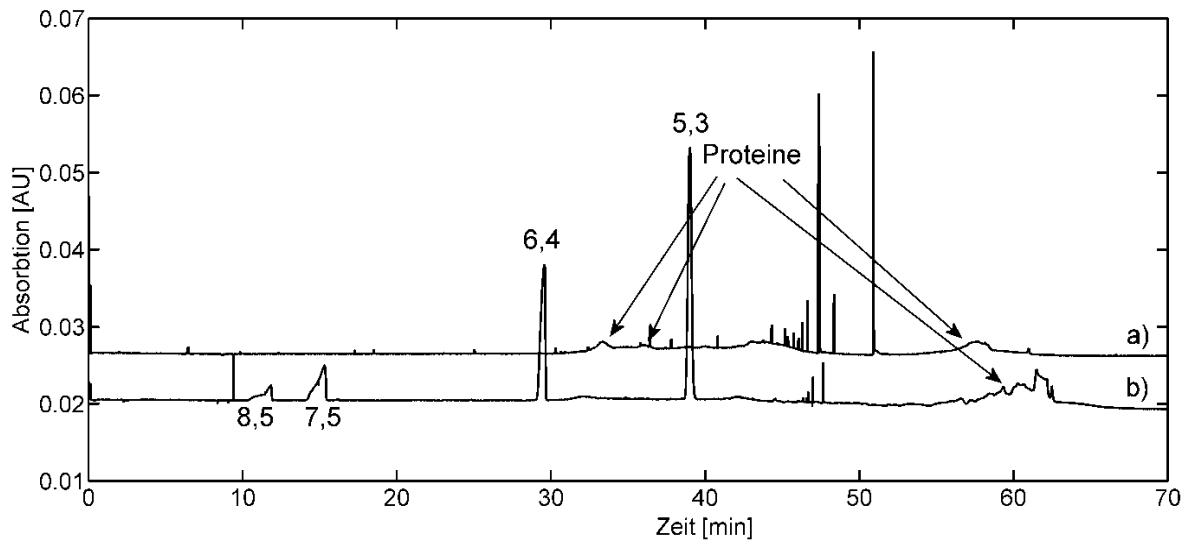


Abbildung 5-5: Trennung der Cohn-Fraktion IV-4 mit Pharmalyte™ 5-8

Für die Kupplung mit MALDI-TOF MS werden höhere Proteinkonzentrationen als sonst in der CIEF üblich benötigt. Natürlich verschlechtert eine höhere Konzentration die Qualität der Elektropherogramme und der Auswertung; dies zeigt sich besonders in der Verschlechterung der Auflösung. Die Injektionszeit wurde variiert und bis auf 5 min bei 1030 mbar erhöht.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Der erste Schritt für den Einsatz der CE in der Proteom-Forschung ist getan. Im Weiteren muss die Kompatibilität mit der Massenspektrometrie im Online- und Offline-Modus getestet werden. Besonders die Optimierung der notwendigen Konzentration an Proteinen für die MS und der notwendigen Zusätze für eine saubere Trennung in der Kapillarelektrophorese ist dabei die größte Herausforderung.

Bis eine funktionstüchtige, robuste Kombination beider Techniken entwickelt wird, wird die 2D-Gelelektrophorese weiterhin der Standard in der Proteom-Forschung sein. Auch diese weithin etablierte Technik lässt sich noch optimieren, um somit den Anforderungen einer quantitativen Aussage nachzukommen. Hier seien besonders die Arbeiten von Simone Schröder und Xi Deng erwähnt, die zu einer SOP für die Ausführung der SDS-PAGE führten. Damit lassen sich bereits in einer Dimension Präzisionen von 3% erreichen [34, 155]. Wenn diese Arbeitsanweisung auf zwei Dimensionen angewendet werden kann, so wird die 2D-Gelelektrophorese auch weiterhin der Standard sein.

6 Kapillargelelektrophorese für präzise Proteinquantifizierung

6.1 Proteinanalytik in der pharmazeutischen Industrie

Laut vfa, dem Verband der forschenden Arzneimittelhersteller, sind derzeit 155 Arzneimittel mit 116 verschiedenen, gentechnisch hergestellten Wirkstoffen in Deutschland zugelassen [103]. Das sind 5% der zugelassenen Wirkstoffe, die allerdings mittlerweile einen Anteil von 16% am Arzneimittelumsatz haben. Der Anteil an gentechnisch hergestellten Wirkstoffen wird auch weiterhin steigen, da 15-25% der neu eingeführten Wirkstoffe aus diesem Bereich kommen. Neben Insulin sind vor allem monoklonale Antikörper gegen Krebserkrankungen und Immunmodulatoren für die Therapie von Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis auf dem Markt [103].

Die Anforderungen an die Analytik dieser Substanzen sind im Vergleich zu der Analytik von kleinen Molekülen zwar gleich, die Methoden sind aber wesentlich aufwendiger. Auch Proteine müssen mit einer Präzision von 2%, berechnet als relative Standardabweichung, quantifizierbar sein. Häufig wird dabei der Gesamtproteingehalt UV-metrisch vermessen [156].

In der aktuellen Literatur wird für die Reinheitsprüfungen von monoklonalen Antikörpern häufig die Kapillargelelektrophorese eingesetzt [23, 29, 35]. Diese Methode sollte im Arbeitskreis etabliert, mit besonderem Augenmerk auf die Präzision optimiert und für pharmazeutische Analysen getestet werden.

6.2 Methodentransfer und –optimierung

Grundlage für die CGE-Methode war eine Standardmethode von Beckman Coulter, die als Application note für die Geräte von Agilent beschrieben wurden [157]. Diese sollte auf der vorhandenen Agilent CE 1600 angewendet werden. In Kapitel 8.5.2 sind die Methodenparameter ausführlich beschrieben. Als Probe wurde eine Mischung aus Myoglobin (17,1 kDa), Carboanhydrase I (28,9 kDa), Ovalbumin (42,9 kDa) und bovinem Serumalbumin (66,5 kDa) hergestellt. Diese Proteine verteilen sich recht gleichmäßig im Größenbereich von 17 – 70 kDa, besitzen aber teilweise sehr unterschiedliche Eigenschaften. So enthält z.B. Myoglobin eine Hämgruppe und absorbiert im Vergleich zu den anderen Proteinen mehr UV-Licht bei der gewählten Wellenlänge von 220 nm. Ovalbumin hingegen wird posttranslational mit einer Kohlenhydratkette mit alternierenden Zuckern und bis zu zwei Phosphorylierungen modifiziert [158] und ist ein Gemisch.

In Abbildung 6-1 ist ein Elektropherogramm der ersten Serie (n=6 Läufe) zu sehen. Auf Anhieb konnte die Methode etabliert werden, bereits die ersten Elektropherogramme zeigten eine hohe Auflösung der Peaks und die Proteine konnten nach ihrer Größe getrennt werden. Die Ergebnisse (siehe Tabelle 6-1) zur Präzision der Peakflächen in dieser Serie waren jedoch nicht zufriedenstellend.

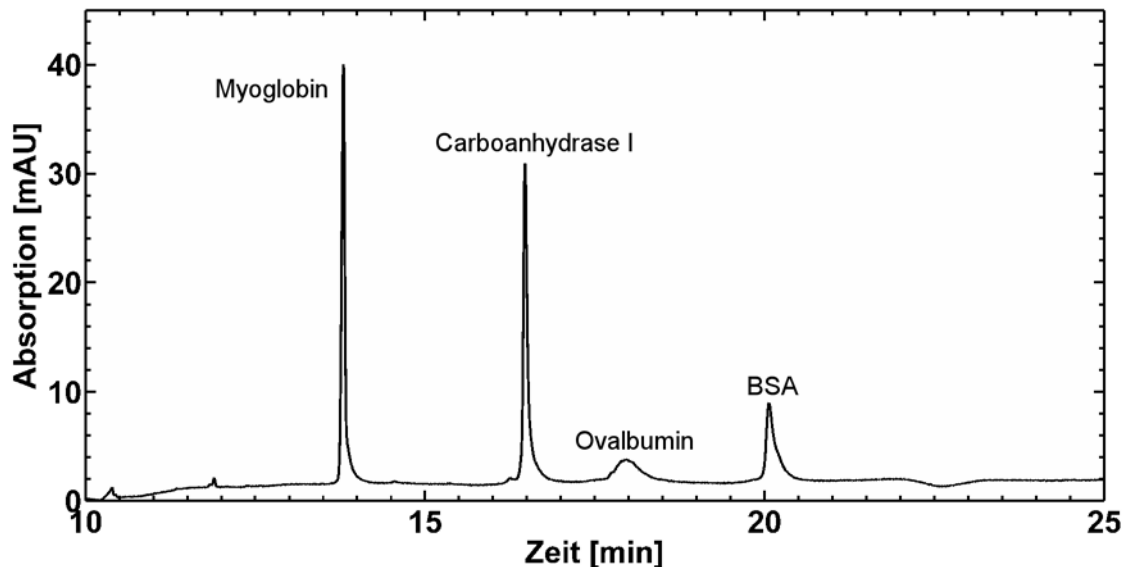


Abbildung 6-1: Elektropherogramm der Standardproteinmischung

Tabelle 6-1: Relative Standardabweichungen der ersten Serie (n=6)

Protein	RSD%	
	Migrationszeit	Peakfläche
Myoglobin	0,90	16,10
Carboanhydrase I	1,02	18,08
Ovalbumin	1,17	27,53
BSA	1,19	14,50

Die Auswertung der Peakflächen ergaben RSD%-Werte von 14-27%, gerade für eine kleine Serie sind dies schlechte Werte. Wenn man sich die Elektropherogramme genauer anschaute, so ließen sich drei Hauptfehlerquellen ausmachen. Erstens waren die Signal-Rauschverhältnisse (berechnet nach Gleichung 2) von Ovalbumin und BSA für eine gute Quantifizierung zu klein (<20), das Verhältnis für Ovalbumin lag sogar unter der Bestimmungsgrenze (LOQ, Engl.: Limit of quantitation). Die zweite Fehlerquelle war die Injektion. Üblicherweise wird in der Kapillargelelektrophorese die Probe elektrokinetisch injiziert. Die Präzision der elektrokinetischen Injektion ist im Vergleich mit der hydrodynamischen Injektion dieser unterlegen [159], allerdings wird diese nur in wenigen

Artikeln über CGE behandelt [37, 160, 161]. Als dritte Fehlerquelle wurde die Integration ausgemacht.

Um diese Fehler zu beseitigen gibt es verschiedene Konzepte. Das Signal-Rauschverhältnis konnte mit größeren Konzentrationen und verlängerten Injektionszeiten erhöht werden (Tabelle 8-10). Die Unregelmäßigkeiten in der Integration wurden mit einem Wechsel zu K.I.S.S., der hauseigenen Integrationssoftware nach Referenz [162], verbessert (Kapitel 8.2).

Die klassische Lösung, um einen Injektionsfehler zu kompensieren, ist die Anwendung eines internen Standards (IS). Alle Peakflächen und Migrationszeiten werden auf die jeweiligen Werte des IS bezogen, somit fungiert der IS als relative Bezugsgröße. Schwankungen, die sich auf alle Analyten auswirken und damit eben auch auf den IS, können so kompensiert werden. Auch für die Kapillargelelektrophorese gelten die Anforderungen an IS, die in Kapitel 2.6 beschrieben sind. Hier können sie aber vornehmlich nach ihrem molekularen Gewicht ausgewählt werden. In einigen Publikationen wird ein 10 kDa großes Protein als interner Standard genutzt [29, 157]. Allerdings verliert der IS durch den Bezug auf sich selber jegliche Information über seine eigene Präzision. Eine weitere Möglichkeit der Normalisierung ist die sogenannte 100%-Methode. Hier wird die Summe aller Peakflächen der Analyten gebildet und jede einzelne Peakfläche auf diese Summe bezogen. Dementsprechend wird das prozentuale Verhältnis der Mischung dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass mehr als ein Peak im Elektropherogramm vorhanden sein sollte. Falls dem nicht so ist, kann ein IS zugesetzt werden. Der Injektionsfehler kann so kompensiert werden; Mittelwert und (relative) Standardabweichung können fehlerbereinigt dargestellt werden. Diese Herangehensweise ist gerade für die Kapillargelelektrophorese geeignet, da bereits die ersten Ergebnisse (siehe Tabelle 6-1) eine hohe Reproduzierbarkeit der Migrationszeit zeigten. Somit ist kein IS für eine Korrektur der Migrationszeiten notwendig.

Um die Konzentration der Probe in der Kapillare zu erhöhen, wurden zum einen die Injektionszeiten verlängert, aber auch die Spannung der elektrokinetischen Injektion erhöht. Als Vergleich wurde während der Optimierung auch die hydrodynamische Injektion genutzt. Der Druck sowohl für Injektionen als auch für Spülungen wurde auf seine Reproduzierbarkeit der Probenmengen getestet, die injiziert werden konnten. Tabelle 8-10 fasst die verschiedenen Parameter zusammen. Aus der Optimierung sind zwei Einstellungen hervorgegangen, einmal elektrokinetisch, einmal hydrodynamisch injiziert, die auf ihre Präzision in langen Serien hin untersucht wurden. Nachfolgend werden die Ergebnisse bewertet, Kapitel 6.3 vergleicht dann die verschiedenen Injektionsmodi anhand statistischer Tests.

Mithilfe von Kontrollkarten lassen sich auf den ersten Blick bei langen Serien Muster erkennen und Präzisionen bewerten. In Abbildung 6-2, zum Beispiel, sind die Peakflächen der einzelnen Proteine im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, wie stark die Werte streuen, Tabelle 6-2 präsentiert die dazugehörigen relativen Standardabweichungen zwischen 4,4 und 8,0%. Desweiteren wird deutlich, dass die Werte der Proteine sich gleichsinnig verändern. Dies deutet vor allem auf einen Injektionsfehler als hauptsächliche Variation hin. Wenn die Peakflächen, wie bereits weiter oben vorgeschlagen, auf die Summe der Peakflächen bezogen werden um den Injektionsfehler zu kompensieren, so verbessert sich die relative Standardabweichung deutlich (siehe Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3). Im Anhang sind weitere Kontrollkarten zusammengestellt, auch für die relativen Peakflächen, berechnet nach der 100%-Methode, sowie für die Migrationszeiten (siehe Abbildung 10-2 und folgende).

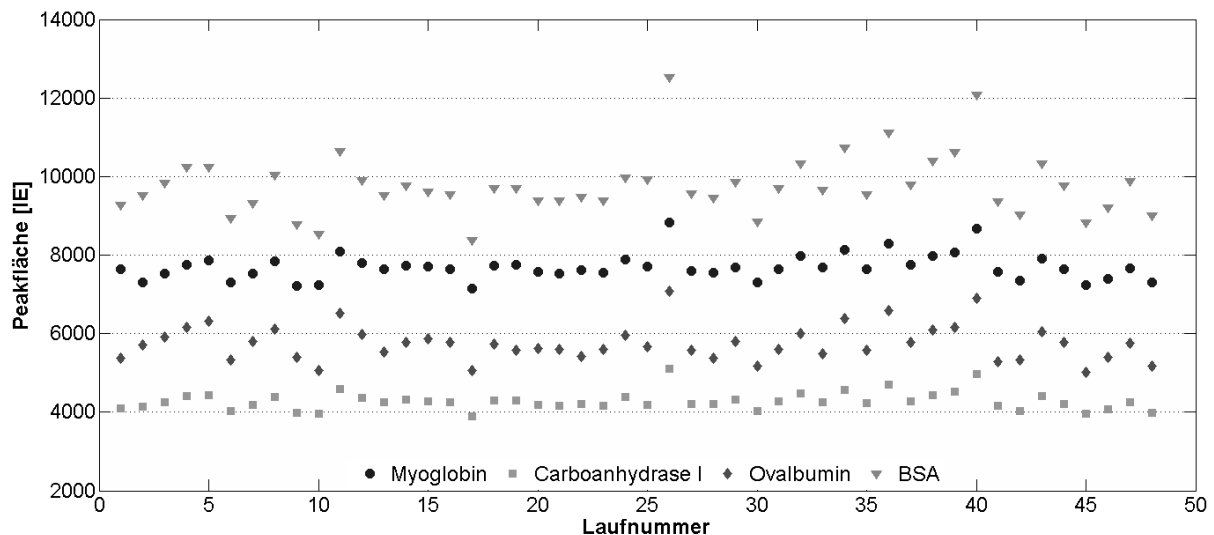


Abbildung 6-2: Kontrollkarte über die Peakfläche, aufgenommen während einer langen Serie (n=48), hydrodynamisch mit 50 mbar für 240 sec injiziert

Bei allen Serien, die während der Etablierung, der Optimierung und der Erhebung der Präzisionsdaten durchgeführt wurden, waren die Migrationszeiten reproduzierbar. Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 zeigen dies für die langen Serien noch einmal deutlich. Die relativen Standardabweichungen liegen meist deutlich unter 2%. Wenn man einen IS nutzen würde, so lägen die RSD%-Wert sogar bei 0,1% (Tabelle 10-1 und folgende). Diese sehr guten Werte konnten aufgrund der ausführlichen Spülprozedur erreicht werden. Auch in Referenz [38] wurden alkalische, saure und neutrale Spülungen getestet. Für die Kapillargelelektrophorese wird sogar eine Kombination aus 0,1 molarer Natronlauge, 0,1 molarer Salzsäure und Wasser eingesetzt. Die erste Spülung mit Natronlauge entfernt adsorbierte Proteine. In einem zweiten Spülschritt wird die Kapillare mit Salzsäure behandelt. Eine Protonierung der Silanolgruppe schützt die Kapillarwand vor weiterer Adsorption und

unterdrückt den EOF. Die erneute Deprotonierung während der Trennung im alkalischen Puffer ist ein langsamer Prozess, so dass die Adsorption auch während der Trennung vermindert ist [38].

6.3 Vergleich von verschiedenen Injektionsarten

Gewöhnlich wird in der Kapillargelelektrophorese die elektrokinetische Injektion eingesetzt. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde auch die hydrodynamische Injektion während der Optimierung getestet. Anhand der langen Serien (jeweils $n=48$) konnten dann die verschiedenen Modi miteinander verglichen werden, um die bessere Variante zu ermitteln.

Verglichen wurden die elektrokinetische Injektion bei -10 kV über 30 sec und die hydrodynamische bei 50 mbar über 240 sec, jeweils mit 48 Trennungen. Die Ergebnisse wurden ohne Normalisierung, mit Normalisierung auf einen internen Standard und mit Normalisierung auf die Gesamtfläche ausgewertet. Die Tabelle 6-2 und die Tabelle 6-3 präsentieren die zusammengefassten Ergebnisse und deren Aussagen zur Präzision. In den gewählten Injektionssettings ergaben sich unterschiedlich große Peakflächen. Die Peakflächen für die hydrodynamische Injektion sind kleiner, aber wie in Abbildung 6-3 zu sehen ist, waren die Peaks etwa gleich hoch. Da während der hydrodynamischen Injektion auch Probenpuffer mit injiziert wird, kann man annehmen, dass ein zusätzlicher Stackingeffekt vorhanden war [76 und Kapitel 2.3.3].

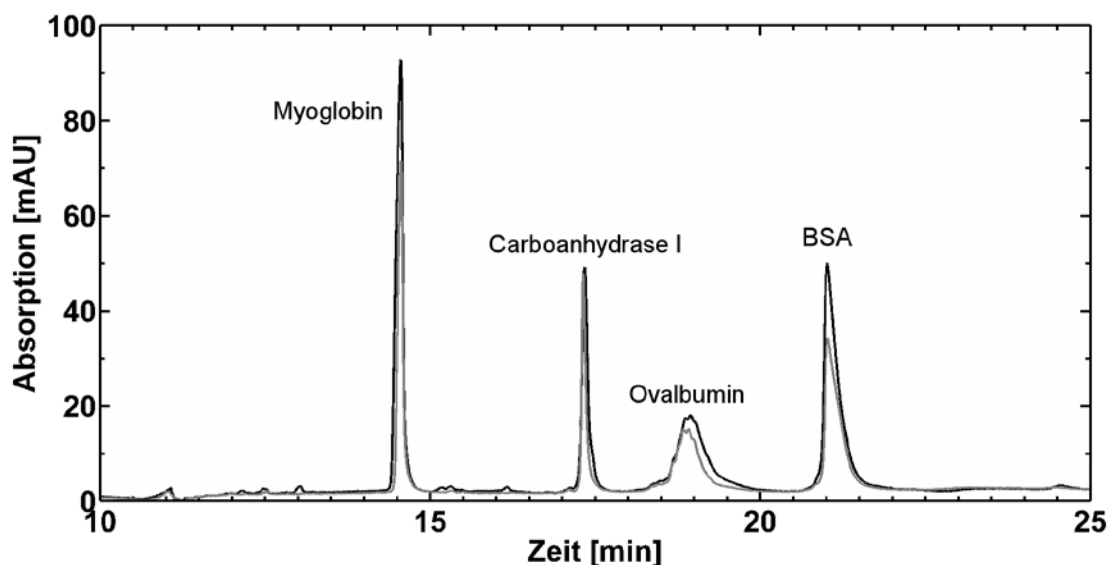


Abbildung 6-3: Vergleich der elektrokinetischen (schwarz) und hydrodynamischen (grau) Injektion der gleichen Probe.

Tabelle 6-2: Zusammenfassung der Ergebnisse zur hydrodynamischen Injektion (n=48)

Hydrodynamische Injektion									
Mittelwert			RSD%		RSD% mit internem Standard		Peakfläche mit 100%-Methode		
Migrations-zeit [min]	Peakfläche [IU]	Migrations-zeit	Migrations-zeit	Peakfläche	Migrations-zeit	Peakfläche	Mittelwert [%]	RSD%	
Myoglobin	14.33	7694	0.76	4.39	0.11	1.41	28.02	2.24	
Carboanhydrase I	17.03	4279	0.77	5.56	Interner Standard		15.57	1.15	
Ovalbumin	18.56	5755	0.84	7.88	0.13	3.04	20.92	2.20	
BSA	20.61	9767	0.84	8.00	0.13	2.57	35.49	1.56	

Tabelle 6-3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur elektrokinetischen Injektion (n=48)

Elektrokinetische Injektion									
Mittelwert			RSD%		RSD% mit internem Standard		Peakfläche mit 100%-Methode		
Migrations-zeit [min]	Peakfläche [IU]	Migrations-zeit	Migrations-zeit	Peakfläche	Migrations-zeit	Peakfläche	Mittelwert [%]	RSD%	
Myoglobin	14.54	14039	1.56	7.73	0.11	3.33	30.46	3.73	
Carboanhydrase I	17.32	6812	1.62	10.34	Interner Standard		14.73	1.65	
Ovalbumin	18.92	9795	1.66	11.88	0.07	3.71	21.15	2.66	
BSA	20.98	15620	1.71	13.59	0.15	4.22	33.66	3.29	

Um eine signifikante Aussage mithilfe von statistischen Tests treffen zu können, muss die Anzahl der Läufe einer Serie größer 20 sein [135]. In beiden Serien wurde die gleiche Probe verwendet, so dass man sowohl die Standardabweichungen mit einem F-Test als auch die Mittelwerte mit einem t-Test untersuchen konnte. Es wurde geprüft, ob die beobachteten Abweichungen zufällig oder signifikant unterschiedlich sind. Zuerst wurde ein F-Test durchgeführt, danach konnte anhand des Ergebnisses der Zwei-Stichproben-t-Test entweder bei gleichen oder ungleichen Varianzen ausgewählt werden. Sowohl F- als auch t-Test setzen voraus, dass die Daten normalverteilt sind. Dies kann man mithilfe eines Shapiro-Wilk-Tests überprüfen [111, 163].

Der Test ergab für zwei von vier Peaks nach elektrokinetischer Injektion und für einen von vier Peaks nach hydrodynamischer Injektion keine Normalverteilung. Bei einem genaueren Blick auf die Daten und die Berechnungsweise des Testes fiel auf, dass einige Werte oberhalb und unterhalb der jeweiligen Mittelwerte deutlich abwichen. Das galt sogar für alle vier Peaks, nur bei einigen Datenreihen führte dies zu einem Unterschreiten des Grenzwertes im Shapiro-Wilk-Tests und folglich zum Ergebnis „keine Normalverteilung“. Für jeden Wert, der oberhalb lag, war im selben Elektropherogramm ein Peak zu finden, der wesentlich kleiner war. Dieses paarige Verhalten war durch die Normalisierung auf die Gesamtfläche entstanden. Selbst kleinere Veränderungen in einem Peak, z.B. auch durch die Integration, wirkten sich so auf alle anderen Peaks aus. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Daten als normalverteilt angesehen und mit F- und t-Test weiteruntersucht. Bei der Untersuchung bleibt allerdings ein Restrisiko durch die mögliche Anwendungsverzerrung ein falsches Ergebnis zu erhalten. Andererseits verliert man durch die Nutzung von parameterfreien Tests Trennschärfe, die für die Fragestellung aber von Nöten war.

6.3.1 F-Test

Der F-Test kann anzeigen, ob zwischen zwei Varianzen bzw. Standardabweichungen ein signifikanter Unterschied besteht [111]. Zuerst wurde für alle vier Proteine die Prüfgröße $F_{\text{Prüf}}$ nach Gleichung 24 (Kapitel 3.4.1.2) berechnet, die Standardabweichungen s_1 und s_2 der beiden Injektionsmodi können aus Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 berechnet werden. Verglichen wurden die Werte nach der Normalisierung auf die Gesamtfläche, um den Injektionsfehler zu kompensieren.

Die Prüfgröße wurde dann gegen einen tabellierten Wert F_{Tab} getestet. Dieser konnte mithilfe von Excel® und der Funktion FINV erzeugt werden. Neben den Freiheitsgraden von beiden Datenreihen wurde noch das Signifikanzniveau α benötigt. Für die zweiseitige Fragestellung

wurde $\alpha=5\%$ gewählt, in der Berechnung von F_{Tab} musste dann $\alpha/2=2,5\%$ eingesetzt werden. Wenn $F_{\text{Prüf}}$ kleiner war als F_{Tab} , so wurde die Nullhypothese H_0 „Die Varianzen sind gleich.“ beibehalten. Andererseits wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese H_1 „Die Varianzen sind signifikant unterschiedlich.“ angenommen [111].

Es zeigte sich, dass nur die Standardabweichungen des Ovalbumins nicht signifikant unterschiedlich sind, für alle weiteren Proteine wurden die Nullhypothesen zu Gunsten der Alternativhypothesen verworfen. Es lagen somit signifikante Unterschiede in den Standardabweichungen vor. Mit diesem Ergebnis musste für die Untersuchung der Mittelwerte der Zwei-Stichproben-t-Test bei ungleichen Varianzen, auch Welch-t-Test genannt, durchgeführt werden.

6.3.2 Welch-t-Test

Der Welch-t-Test untersucht die Mittelwerte aus zwei unterschiedlichen Grundgesamtheiten bei ungleichen Varianzen [111]. Wie bereits der F-Test wurde auch der Welch-t-Test für die Daten durchgeführt, die auf die Gesamtfläche normalisiert wurden. Dafür wurde $t_{\text{Prüf}}$ nach Gleichung 25 (Kapitel 3.4.1.3) berechnet, die benötigten Mittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 , die Standardabweichungen s_1^2 und s_2^2 , sowie die Datenanzahl n können Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 entnommen werden.

Die Prüfgröße $t_{\text{Prüf}}$ wurde mit einem tabellierten Werte verglichen. Dieser konnte mit der Funktion TINV der Software Excel® erzeugt werden. Ebenfalls wurde wieder die Definition eines Signifikanzniveaus gefordert, festgelegt wurde dieses auf $\alpha=5\%$. Da es sich auch bei diesem Test um eine zweiseitige Fragestellung handelte, wurde zur Berechnung von t_{Tab} $\alpha/2=2,5\%$ eingesetzt. Die Tabellenwerke für t_{Tab} benötigen nur die Angabe eines Freiheitsgrades. Dieser wurde nach Gleichung 44 berechnet und auf eine ganze Zahl gerundet.

$$f = (n-1) + \frac{2n-2}{\frac{s_1^2}{s_2^2} + \frac{s_2^2}{s_1^2}}$$

Gleichung 44: Berechnung der Freiheitsgrade für einen Welch-t-Test bei gleicher Datenanzahl n

Voraussetzung von Gleichung 25 (Kapitel 3.4.1.3) und Gleichung 44 war die gleiche Datenanzahl der beiden zu untersuchenden Stichproben. Die Nullhypothese H_0 lautet „Die Mittelwerte stammen aus der gleichen Grundgesamtheit.“. Wenn diese verworfen wird, da

$t_{\text{Prüf}}$ größer ist als t_{Tab} , so kann die Alternativhypothese H_1 „Die Mittelwerte stammen aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten.“ angenommen werden.

Bereits ohne statistischen Test konnte man im Vergleich von Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 erkennen, dass die Mittelwerte voneinander abweichen. Der Welch-t-Test bestätigte diese Beobachtung für Myoglobin, Carboanhydrase I und BSA. Obwohl Ovalbumin bereits im F-Test keine signifikanten Unterschiede in den Varianzen zeigte, wurde ebenfalls der Welch-t-Test durchgeführt. Der Unterschied zum normalen t-Test, der eigentlich zum Einsatz kommen müsste, war vernachlässigbar. Die Prüfgröße wird in beiden Tests gleich berechnet, nur die Freiheitsgrade werden auf verschiedene Weisen ermittelt. In diesem Beispiel änderte sich durch unterschiedliche Freiheitsgrade der tabellierte Wert t_{Tab} in der dritten Nachkommastelle. Die Wahl des Testes hatte somit keinen Einfluss auf das Ergebnis „ H_0 wird beibehalten.“.

6.3.3 Interpretation

Mit den Ergebnissen aus den statistischen Tests konnten die zwei Injektionsmodi mit einander verglichen und bewertet werden. Tabelle 6-4 fasst die Ergebnisse der Tests noch einmal zusammen, die Daten aus der Tabelle sind im Zusammenhang mit Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 zu sehen.

Tabelle 6-4: Zusammenfassung der statistischen Auswertung

Proteine	$F_{\text{Prüf}}$	F_{Tab}	Ergebnis	$t_{\text{Prüf}}$	t_{Tab}	Ergebnis
Myoglobin	3,28	1,78	H_1	13,04	2,29	H_1
Carboanhydrase I	1,85		H_1	19,24	2,28	H_1
Ovalbumin	1,50		H_0	2,22	2,28	H_0
BSA	3,97		H_1	10,28	2,29	H_1

Die relativen Standardabweichungen waren signifikant unterschiedlich, die hydrodynamische Injektion war der elektrokinetischen überlegen. Auch der Vergleich der Mittelwerte zeigte signifikante Unterschiede, obwohl die gleiche Probe injiziert wurde. Das Problem der elektrokinetischen Injektion ist, dass die Injektionsmenge abhängig von der Mobilität der Analyten ist. Schneller migrierende Substanzen, wie Myoglobin in diesem Beispiel, treten in einer größeren Menge als im Vergleich zu der hydrodynamischen Injektion in die Kapillare ein, langsamere Analyten hingegen in einer deutlich kleineren Menge. Die Verhältnisse in Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 zeigen dies eindrücklich.

Die statistische Auswertung verdeutlicht die Überlegenheit der hydrodynamischen Injektion über die elektrokinetische. Der einzige Nachteil war die wesentlich längere Injektionszeit von

4 min. Diese kann aber mit aktuellen CE-Systemen wieder verkürzt werden, da sowohl die Agilent 7100 CE, als auch die PA 800 CE von Beckman bei höheren Drücken injizieren kann.

6.4 Linearitätsmessung

Zur Charakterisierung der optimierten Methode wurde die Linearität überprüft. Nach den Vorgaben der Internationalen Konferenz für Harmonisierung (ICH, Engl.: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) wurden 5 verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Drei der vier Proteine: Myoglobin, Ovalbumin und BSA, wurden gleichzeitig vermessen. Die Carboanhydrase I wurde während der Linearitätsuntersuchung nicht eingesetzt, da diese nur in geringen Mengen zu Verfügung stand. In Tabelle 8-8 sind alle genutzten Konzentrationen zusammengestellt.

Für die Auswertung ist eine zusätzliche Rechnung notwendig, wenn die Normalisierung auf die Gesamtfläche zur Kompensierung des Injektionsfehlers genutzt werden soll. Die Verhältnisse können nicht direkt genutzt werden, sie müssen noch mit dem Mittelwert der Gesamtfläche multipliziert werden. So entstehen korrigierte Peakflächen der einzelnen Proteine. In Abbildung 6-4 wurden diese dann gegen die Konzentrationen aufgetragen, eine lineare Regression berechnet und die dazugehörigen Kenngrößen im Diagramm mit dargestellt.

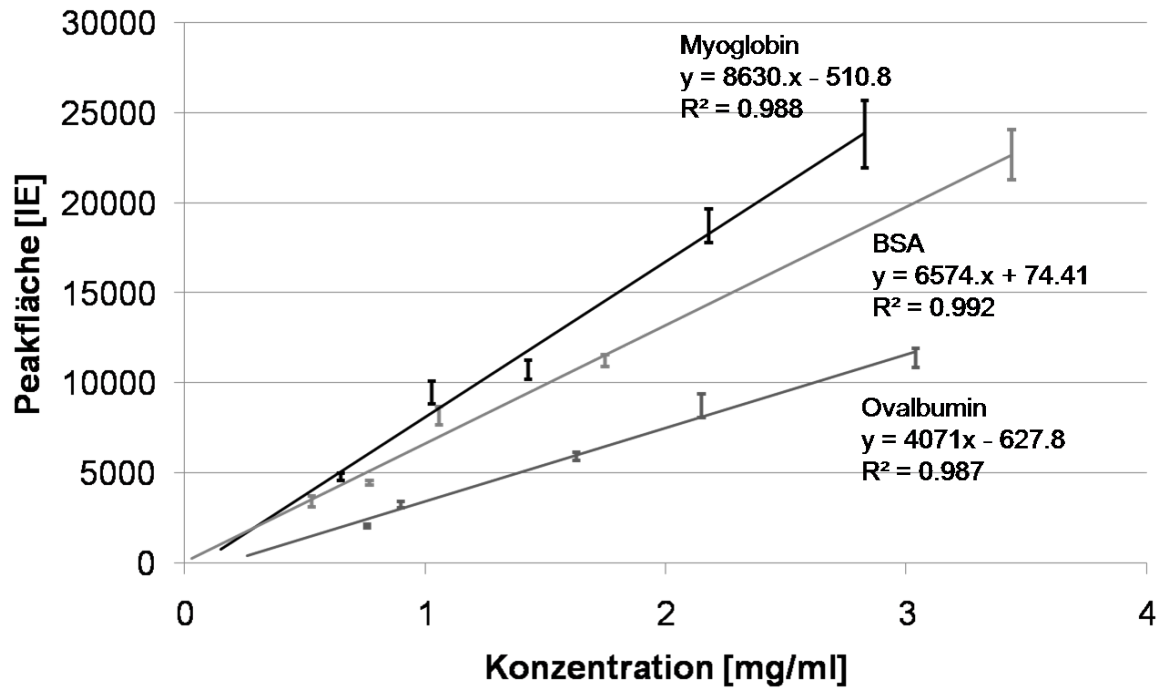


Abbildung 6-4: Untersuchung der Linearität für Myoglobin, Ovalbumin und BSA, mit dazugehörigen Gleichungen und Bestimmtheitsmaßen. Desweiteren sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen eingezeichnet

Diese, wie z.B. das Bestimmtheitsmaß R^2 , zeigen den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche im gewählten Setup. BSA zeigt von allen getesteten Proteinen die besten Kenngrößen, es wird häufig auch eingesetzt um unbekannte Proteine zu quantifizieren. Im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 3,5 mg/ml verhielten sich alle Proteine in der Methode linear.

Mithilfe der Linearitätsuntersuchung wurden die Detektions- und Bestimmungsgrenzen (LOD bzw. LOQ) berechnet. Die Höhen der verschiedenen Konzentrationen und ein durchschnittliches Rauschen wurden genutzt um diese Werte zu bestimmen.

Tabelle 6-5: Detektions- und Bestimmungsgrenze für Myoglobin, BSA und Ovalbumin

	LOD	LOQ
Myoglobin	0,04 mg/ml	0,1 mg/ml
BSA	0,1 mg/ml	0,23 mg/ml
Ovalbumin	0,2 mg/ml	0,5 mg/ml

Myoglobin besitzt den größten Absorptionskoeffizienten und damit auch die kleinsten Grenzen. Ovalbumin als Gemisch erzeugt breite Peaks (siehe auch Abbildung 6-1 und Abbildung 6-3), teilweise sogar mit mehreren Spitzen, deswegen muss die fünffache Menge eingesetzt werden um die gleich Peakhöhe zu erreichen.

6.5 Abhängigkeit der Präzision vom Signal-Rausch-Verhältnis

Für quantitative Analysen ist sowohl in der CE als auch in der HPLC eine hohe Richtigkeit und Präzision nötig. Mögliche Fehlerquellen, die die Quantifizierung erschweren können, sind unter anderem die Probenvorbereitung, die Injektion und die Integration [164]. Letztgenannte ist von verschiedenen Faktoren abhängig, z.B. dem Rauschen der Basislinie, der Frequenz der Datenerfassung und auch vom Signal-Rausch-Verhältnis [54]. Die Variation in der Integration ist der dominierende Fehler in der Analyse kleiner Konzentrationen. Besonders das Rauschen hat einen Effekt auf die Bestimmung der Basislinie und kann die Integration entscheidend beeinflussen (siehe Referenz [164] und Kapitel 2.1.3.1). Als Lösung bietet sich an das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Für die untersuchten Parameter in den Referenzen [164, 165] hat das Signal-Rausch-Verhältnis den größten Effekt auf die Präzision.

Es stellt sich nun die Frage, welches Verhältnis man benötigt, um den Effekt des Rauschens zu minimieren. Für flüssigchromatographische Verfahren sind einige Gleichungen und Regeln aufgestellt worden. Snyder et al. [166] beschreiben z.B. die Präzision der Peakhöhe mit Gleichung 45, wobei %RSD die relative Standardabweichung und S/N das Signal-Rausch-Verhältnis repräsentiert.

$$\%RSD = \frac{50}{S/N}$$

Gleichung 45: Schätzung der Präzision als %RSD nach Dolan [167]

So kann man das benötigte Verhältnis anhand der gewünschten Präzision schätzen, nach Referenz [167] ist es auch möglich nach Gleichung 45 die Präzision von Peakflächen abzuschätzen. Diese Gleichungen gelten vornehmlich für die HPLC, für die CE gibt es noch keine Untersuchungen. Allerdings kann man annehmen, dass sich die Präzisionen ähnlich verhalten, da CE und HPLC die gleiche Detektionstechnik nutzen. Allerdings lässt der kürzere Lichtweg in der CE die Detektion empfindlicher gegenüber Rauschen reagieren [168]. Deswegen sollte man immer mit möglichst hohen Konzentrationen arbeiten, die noch nicht die Trennung beeinflussen [18]. Die Signal-Rausch-Verhältnisse und Präzisionen der Daten aus den Kapiteln 6.2 und 6.4, Transfer, Optimierung und Linearitätsbestimmung, wurden in Beziehung gesetzt, um eine Aussage über das erforderliche Signal-Rausch-Verhältnis zu treffen.

Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde nach dem Europäischen Arzneibuch berechnet (Referenz [30] und Gleichung 2) und ist in Kapitel 2.1.3.1 erklärt. Dreißig Sekunden vor und

nach den Peaks wurde genutzt um das Maximum und das Minimum der Basislinie zu finden. Die Peakhöhe wurde vom Integrationsprogramm K.I.S.S. ermittelt.

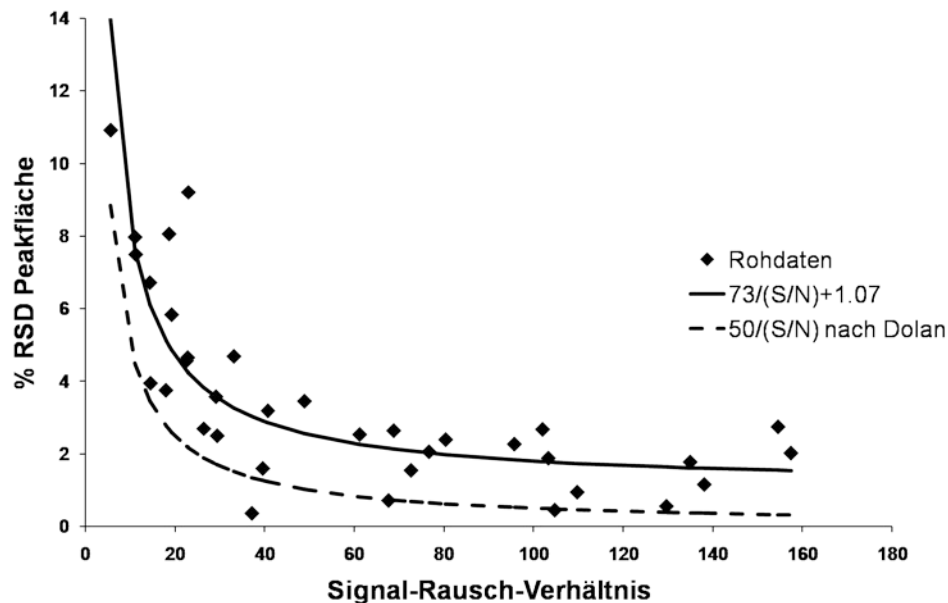


Abbildung 6-5: Experimentelle Daten und Regressionskurven im Vergleich zur Funktion nach Dolan [167].

In Abbildung 6-5 sind Signal-Rausch-Verhältnis und RSD-Werte aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Regression durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine Regression der RSD-Werte gegen den Prädiktor $1/S$ ohne Achsenabschnitt berechnet, danach die absoluten Werte gegen den gleichen Prädiktor. Die zweite Regression wurde als Gewichtung für die endgültige Regression genutzt (siehe Gleichung 46)

$$\%RSD = \frac{73}{S/N} + 1,07$$

Gleichung 46: Schätzung der Präzision als %RSD für die CE

Die Funktion nach Dolan und die berechnete Regressionskurve ist ebenfalls in Abbildung 6-5 dargestellt, die dargestellten Werte sind in Tabelle 10-10 aufgeführt.

Gleichzeitig mit der Regression für CE wurde auch für unterschiedliche HPLC-Daten die oben beschriebene Prozedur durchgeführt (siehe Referenz [54] und Gleichung 47).

$$\%RSD = \frac{58}{S/N} + 0,30$$

Gleichung 47: Schätzung der Präzision als %RSD für die HPLC

Anhand der Gleichungen sieht man, dass der Zusammenhang zwischen RSD und S/N in CE und HPLC ähnlich ist. Beide Verfahren nutzen die gleiche Detektionstechnik, aber die deutlichen Unterschiede in den Schichtdicken (50-100 μm vs. 1-10 mm) machen sich in den Gleichungen bemerkbar. Der lineare Teil der Gleichung spiegelt das Rauschen wieder, was

in der CE eine größere Rolle spielt. Die Variabilität in der Probeninjektion beeinflusst den konstanten Teil der Funktion [164]. Dieser ist aufgrund der speziellen Injektionstechnik in der HPLC kleiner als in der CE. Wenn man allerdings die Vorraussetzungen der Datenerhebung vergleicht, so stellt man fest, dass für die HPLC die Substanzen kleine Moleküle ($M_r < 1000$ Da) mit hohen Absorptionskoeffizienten sind. Für die CE-Methode wurden ausschließlich Proteine mit $M_r > 10$ kDa genutzt, woraus sich eine zusätzliche Fehlerquelle ergeben könnte. Wie bereits in Kapitel 6.2 diskutiert, ist gerade in der Kapillargelelektrophorese die Injektion eine Fehlerquelle. Die hier vorgestellte Gleichung ist also eher als ungünstigster Fall einzuordnen. Für z.B. Kapillarzonenelektrophorese von kleinen Molekülen kann man eine ähnliche Funktion wie in der HPLC annehmen.

Im Vergleich von HPLC und CE werden auch noch weitere Effekte sichtbar [54]. In der Kapillarelektrophorese hat man verschiedene Möglichkeiten das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Neben größeren Injektionsmengen kann man auch verschiedene Methoden zum Stacking nutzen. Das sogenannte „Stapeln“ von Analyten in der Kapillare führt zu schmalen und höheren Peaks und damit zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis (Kapitel 2.3.3). In Tabelle 10-10 sind sowohl Datensätze vertreten, die elektrokinetisch als auch hydrodynamisch injiziert wurden. Da während der hydrodynamischen Injektion gleichzeitig mit den Analyten Puffer eingespritzt wird, der eine geringere Ionenstärke als der Gelpuffer besitzt, können die Analyten in der Pufferzone gestapelt werden [76].

Ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 50 sollte man erreichen, um präzise quantifizieren zu können. Besser ist es, ein $S/N > 100$ zu nutzen. In weiteren Schritten kann man sich dann anderen Fehlerquellen widmen, wie z.B. der Probenvorbereitung und der Kapillaroberfläche.

6.6 Bestimmung von Molekülmassen

Eine typische Anwendung für die Kapillargelelektrophorese ist die Bestimmung von Molekülmassen. Der dekadische Logarithmus der Molekülmassen verhält sich linear zum Kehrwert der Migrationszeit bzw. der Mobilität von Analyten. Mithilfe einer Standardmischung, wie sie zur Optimierung der Methode in Kapitel 6.2 genutzt wurde oder kommerziell z.B. von Beckman erhältlich ist, kann eine Kalibrierung durchgeführt werden. Abbildung 6-6 zeigt ein solches Diagramm mit Regressionsfunktion. Diese kann dann zur Charakterisierung unbekannter Proteine und deren Molekülmasse genutzt werden.

Für Proteine mit Phosphorylierungen und/oder Kohlenhydratketten kann sich die berechnete Molekularmasse verschieben. Das Bindungsverhältnis von SDS zu diesen Teilen der Proteine ist anders und dies macht sich in einer veränderten Mobilität bemerkbar. Zum Beispiel bindet SDS nicht an Kohlenhydratketten, so dass die Ladung des SDS zu klein ist für die Größe des Proteins. Dies führt zu einer Überschätzung der Masse. Allerdings kann man sich das unterschiedliche Bindungsverhalten zu Nutze machen und glykolisierte und nicht-glykolisierte Proteine trennen (siehe dazu Referenz[29] und Kapitel 6.7).

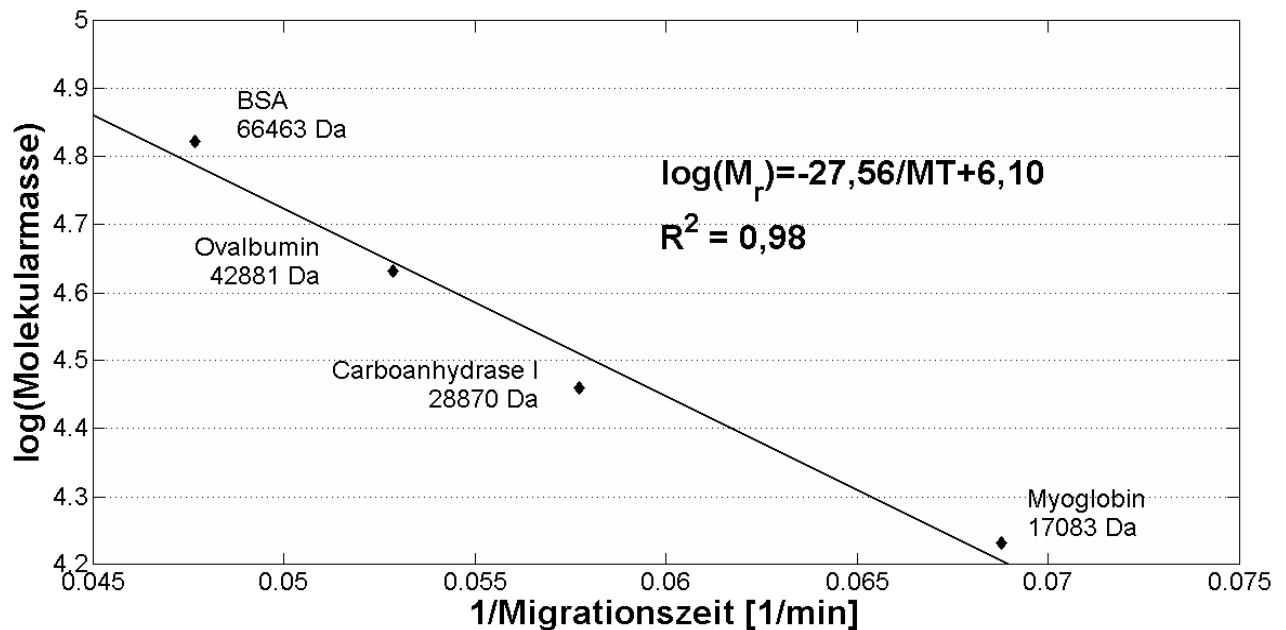


Abbildung 6-6: Diagramm zur Bestimmung der Molekularmasse

6.7 Möglichkeiten für die Qualitätskontrolle

In der Literatur lassen sich viele, auch sehr unterschiedliche Anwendungen für Kapillargelelektrophorese finden [29, 35]. Unter anderem findet sie Einsatz in der Reinheitsprüfung von monoklonalen Antikörpern [23]. Abbildung 6-7 zeigt ein Elektropherogramm eines Modellantikörpers vom IgG1-Typ. Dieser Typ besitzt die klassische Y-förmige Struktur und besteht aus zwei leichten (jeweils 25 kDa) und zwei schweren Ketten (50 kDa), die über Disulfidbrücken verbunden sind [169]. Die Disulfidbrücken können z.B. mit DL-Dithiothreitol (DTT) reduziert werden; es entstehen die einzelnen Ketten. Mit der Kapillargelelektrophorese lassen sich die einzelnen Fragmente trennen. Die Molekularmassenbestimmung, wie sie in Kapitel 6.6 beschrieben ist, hilft die einzelnen Peaks Fragmenten zuzuordnen (siehe Abbildung 6-7). Deutlich zu sehen ist, dass es sich nicht um einen reinen monoklonalen Antikörper in diesem Beispiel handelt. Wenn man die Ergebnisse mit Referenz [29] vergleicht, so ist es wahrscheinlich, dass es sich um die glykolisierte und nicht-glykolisierte Form des Antikörpers handelt (siehe auch Kapitel 6.6).

Dies führt zu zwei Peaks für die schwere Kette und zu zwei Peaks für den kompletten Antikörper.

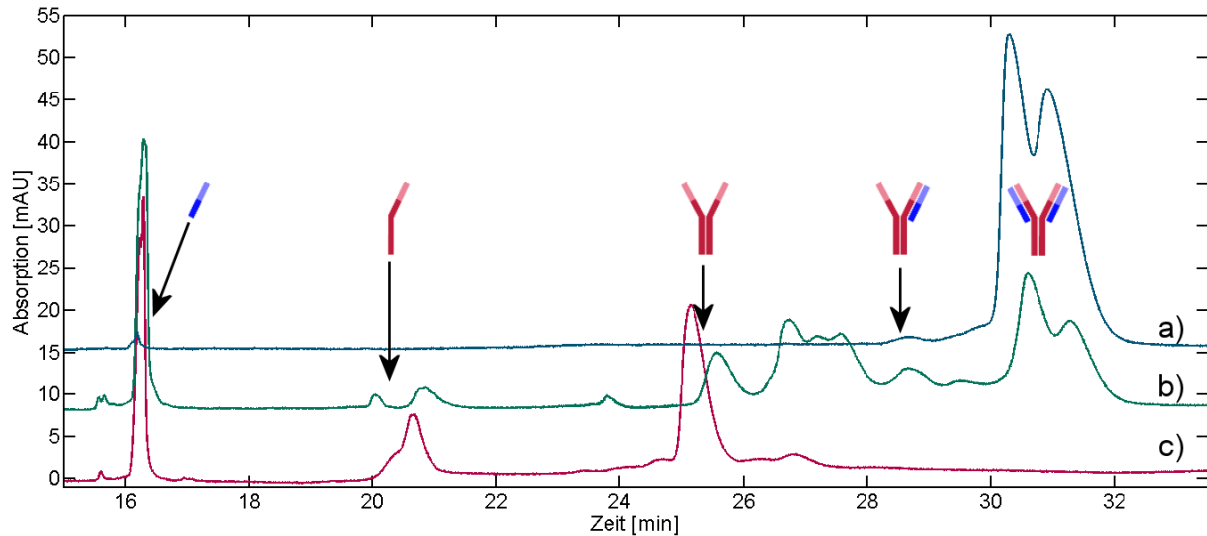


Abbildung 6-7: Elektropherogramm eines Antikörpers vom IgG1-Typ; a) nicht-reduzierter Antikörper; b) teilweise reduzierter Antikörper; c) fast vollständig reduzierter Antikörper

Auch in der Qualitätskontrolle für Lebensmittel kann die CGE eingesetzt werden. Abbildung 6-8 zeigt das Beispiel einer Bierprobe. In einem ersten Schritt wurde die Ausgangsprobe mit einer präparativen isoelektrischen Fokussierung aufbereitet. Danach wurde eine Fraktion mit der CGE getrennt, wobei gleichzeitig Spektren mit dem eingebauten DAD aufgenommen wurden. Anhand der Spektren konnten Proteine und Polyphenole voneinander unterschieden werden.

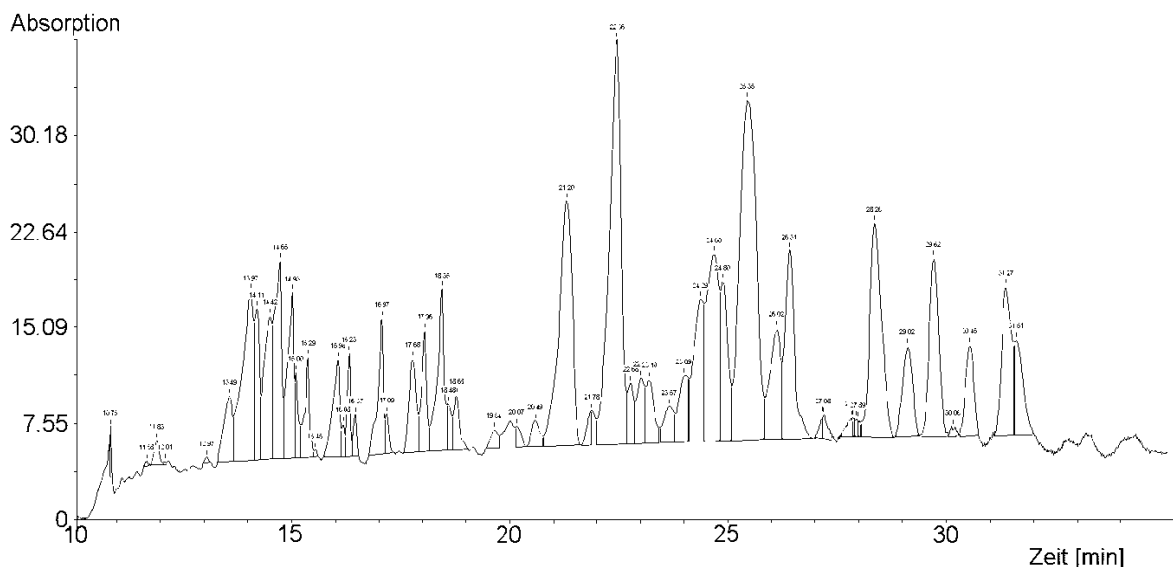


Abbildung 6-8: Elektropherogramm eines Bieres, welches Proteine und Polyphenole enthält

6.8 Zusammenfassung

Im Vergleich mit ähnlichen Methoden, wie z.B. der Größenausschluss- oder der Ionenaustauschchromatographie besitzt die Kapillargelelektrophorese eine höhere Selektivität. Je nach Methode und analytischen Problem ist es mittlerweile auch möglich Proteine in der HPLC zu trennen. Allerdings hängt die Selektivität der Methoden stark von der verwendeten Säulen und der Optimierung jeder einzelnen Methode ab [27]. Die hier vorgestellte präzise CGE-Methode ist allgemein anwendbar. Es konnte gezeigt werden, dass die CGE nicht nur als Reinheitsprüfung eingesetzt werden kann, sondern auch nach sorgfältiger Optimierung die Anforderungen einer Gehaltsbestimmung erfüllen kann. Für spezielle Fragestellungen, wo eine noch höhere Selektivität gewünscht ist, kann die Auflösung mithilfe der Parameter Kapillarlänge und Spannung noch optimiert werden. Weitere Verbesserungsmöglichkeiten liegen in der Anwendung von Stacking- und Fokussierungstechniken.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Produktion von qualitativ hochwertigen und zuverlässigen Daten für verschiedene Fragestellungen in der Kapillarelektrophorese. Egal in welchem Bereich die Kapillarelektrophorese genutzt wird, ein Analytiker muss sich auf die Präzision und die Richtigkeit der Ergebnisse seines Gerätes und seiner Methode verlassen können.

Ein wichtiger Faktor in der Kapillarelektrophorese für richtige und präzise Daten ist die Temperatur. Von ihrer Stabilität und Richtigkeit abhängig ist die Präzision, die mit einer Methode erreicht werden kann. Unter anderem nimmt die Abgabe der Jouleschen Wärme, die aus angelegter Spannung und daraus resultierenden Strom entsteht, Einfluss auf die Temperatur und ihre Verteilung innerhalb der Kapillare. In kommerziell erhältlichen CE-Systemen kann die Temperatur in oder an der Kapillare nicht vom System gemessen werden. Es ist nur vorgesehen, die Temperatur des Kühlungssystems zu überwachen.

In Kapitel 3 wird der Einsatz eines berührungsfreien IR-Thermometers beschrieben, welches an der Oberfläche der Kapillare die Temperatur messen kann. Das Thermometer wurde in verschiedene CE-Systeme eingebaut und ermöglichte so in Kombination der eingesetzten Leistung pro Kapillarlänge Vergleiche durchzuführen. Die wichtigste Erkenntnis ergab sich aus dem Vergleich der Kühlungssysteme (Abbildung 3-15). Trotz angeschalteter Kühlung konnten Temperaturen von bis zu 90°C erreicht werden. Die in diesem Versuch eingesetzte Spannung wird im Routinebetrieb normalerweise nicht genutzt. Es zeigt aber, dass die Kapillarelektrophorese auf gut konstruierte und funktionstüchtige Kühlsysteme angewiesen ist. Aus den gesammelten Erkenntnissen wurde ein Funktionstest entwickelt, der auch in die Qualifizierung von Kapillarelektrophorese eingegangen ist (siehe Abbildung 3-16 und Kapitel 4). Anhand der vorgestellten Funktionen (Tabelle 3-3) für verschiedene Kühlsysteme können in der Routine auch ohne den Einsatz eines IR-Thermometers Temperaturen abgeschätzt werden. Von besonderem Vorteil ist der Einsatz des IR-Thermometers für die Entwicklung und Optimierung von Methoden für sensible Analyten.

Für die Nutzung von analytischen Instrumenten in den Laboren der pharmazeutischen Industrie fordern die Überwachungsbehörden den Einsatz von Qualitätsmanagementsystemen und den Nachweis der Betriebsfähigkeit für jedes einzelne Gerät. Mit ihren Ergebnissen nehmen die analytischen Instrumente Einfluss auf die Sicherheit und die Wirksamkeit von Arzneimitteln. Deswegen muss sich jeder Analytiker auf

die Präzision und Richtigkeit seiner Ergebnisse verlassen können und muss die Integrität der Daten und die Sicherheit der Ergebnisse dokumentieren können. Für jede geplante Anwendung muss die Eignung des Gerätes und der Methode nachgewiesen werden. Die Qualifizierung analytischer Instrumente ist ein lang bewährtes Konzept, um diese Anforderungen zu erfüllen. Dieses Konzept ist in 4 Abschnitte, angelehnt an den Lebenszyklus eines Gerätes, eingeteilt. Die Durchführung der AIQ liegt in der Verantwortung des Nutzers.

Kapitel 4 stellt das Konzept für die AIQ einer Kapillarelektrophorese vor. Für die vier Module der Kapillarelektrophorese, Temperatur, Spannung, Detektion und Injektion, wurden Parameter definiert, Methoden zur Messung entwickelt und Akzeptanzkriterien festgelegt (Tabelle 4-1). Die Parameter können alle einzeln oder in einem holistischen Ansatz getestet werden. Der holistische Ansatz spart Zeit, erreicht aber auch die gleiche Aussage wie eine Einzelprüfung der Parameter, da die Ergebnisse der gemeinsamen Tests für jeden einzelnen Parameter ausgewertet werden. Eine nahezu vollständige PQ kann regelmäßig durch die Erweiterung von Systemtauglichkeitstests durchgeführt werden (Abbildung 4-15). Dabei liegt der Schwerpunkt auf den leistungsbeschreibenden Parametern. Die sogenannte „continuous Performance Qualification“ (cPQ) gibt die Sicherheit einer durchgängig tauglichen Kapillarelektrophorese. Die AIQ ist somit ein unverzichtbares Werkzeug für die Produktion von zuverlässigen, analytischen Daten.

In der Proteom-Forschung wird hauptsächlich die 2D-Gelelektrophorese genutzt, um auf die Suche nach Biomarkern, den Indikatoren für Gesundheit und Krankheit, zu gehen. Durch den Einsatz von automatisierten Techniken soll der Arbeits- und Zeitaufwand reduziert werden ohne das Auflösungsvermögen zu verlieren. In der Kombination von isoelektrischer Fokussierung auf der Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie werden die gleichen Informationen geliefert wie mit dem Einsatz der 2D-Gelelektrophorese.

Die im Arbeitskreis bereits etablierte cIEF-Methode wurde für diese Aufgabe genutzt (Kapitel 5). Mithilfe von substituierten Aminomethylphenole als IEP-Marker wurden zwei verschiedene pH-Gradienten charakterisiert. Die Cohn-Fraktion IV-4, eine Teilfraktion des Blutplasmas mit einer komplexen Proteinzusammensetzung, wurde als Beispiel für eine Trennung injiziert. Die vorbereitenden Arbeiten, die auf Seiten der Kapillarelektrophorese durchgeführt werden müssen, sind abgeschlossen. In weiteren Schritten muss die Kupplung mit einem Massenspektrometer etabliert werden und die Kompatibilität der Methode geprüft werden.

Der Anteil an gentechnisch hergestellten Wirkstoffen steigt kontinuierlich an. Unter dieser Kategorie von Wirkstoffen fallen auch die meisten Proteine und monoklonalen Antikörper. Die Anforderungen an die Analytik für diese Substanzen ist hoch und die Quantifizierung schwierig. Zurzeit wird der Gehalt an Gesamtprotein hauptsächlich mit einer unspezifischen UV-spektroskopischen Messung durchgeführt [156]. In der Literatur wird üblicherweise die Reinheit von monoklonalen Antikörper mit der Kapillargelelektrophorese geprüft [23, 29, 35]. Diese Methode sollte im Arbeitskreis etabliert und für die Quantifizierung von Proteinen optimiert werden.

In Kapitel 6 wird die Etablierung der Methode beschrieben. Der Transfer und die Optimierung wurden mit einem Proteingemisch aus Myoglobin, Carboanhydrase I, Ovalbumin und bovinem Serumalbumin durchgeführt. Von Anfang an war die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten sehr zufriedenstellend; die relative Standardabweichung der Migrationszeiten lagen üblicherweise unter 2%, mit Berechnung über einen internen Standard sogar unter 0,1% (Kapitel 6.2). Die Präzision der Peakflächen wurde in mehreren Schritten verbessert. So wurde zur Berechnung der Ergebnisse die 100%-Methode angewendet, die Injektionsmenge erhöht und der Injektionsmodus von elektrokinetisch auf hydrodynamisch gewechselt. Besonders der Einsatz der hydrodynamischen Injektion hat einen deutlichen Vorteil gebracht, obwohl dies in der Kapillargelelektrophorese nicht üblich ist. Der Vergleich der Injektionsmodi zeigte signifikante Unterschiede und die Überlegenheit der hydrodynamischen Injektion (Kapitel 6.3). Ein weiterer Vorteil der hydrodynamischen Injektion liegt in der Art der Injektion. Im Gegensatz zur elektrokinetischen Injektion, die in Abhängigkeit der Mobilität injiziert, bildet die hydrodynamische Injektion die Zusammensetzung der Probe ab. Mit allen Verbesserungen konnten relative Standardabweichungen von ca. 2% für die Peakflächen erreicht werden. Alle Ergebnisse des Transfers, der Optimierung und der langen Serien wurden auf die Beziehung zwischen Signal-Rauschverhältnis und Präzision hin untersucht. Es wurde gezeigt, dass in der Kapillarelektrophorese, insbesondere für die Analytik von Proteinen, Peaks mit einem Signal-Rauschverhältnis von mindestens 50, besser noch von 100 zur Integration genutzt werden sollten. Dadurch kann die Variabilität durch Rauschen und Integration vermieden werden.

In ihrer Gesamtheit zeigt diese Arbeit, dass alle Anforderungen an die Kapillarelektrophorese erfüllt werden können. Mit den vorgestellten Konzepten und Methoden ist die zuverlässige Arbeit mit der Kapillarelektrophorese in den Laboren der pharmazeutischen Industrie und der Lebenswissenschaften möglich.

8 Experimenteller Teil

8.1 Instrumente

Alle Kapillarelektrophorese-Systeme, die für die vorliegende Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 8-3 mit den dazugehörigen, steuernden Software-Systemen, den Detektoren und den üblichen Kapillarlängen aufgeführt.

Desweiteren wurden folgende Instrumente in dieser Arbeit genutzt:

Tabelle 8-1: Allgemeine Geräte

Analysenwaage	Sartorius BP 211 D, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Sartorius R 160 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Methrom 632 pH-Meter, Methrom AG, Herisau, Schweiz
Magnetrührer	IKA RCT, IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 102, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Spritzenfilter	Rotilabo® Spritzenfilter (PVDF, 0,22µm), Roth, Karlsruhe, Deutschland

8.2 Software

Folgende Software wurde neben der Software, die in Tabelle 8-3 aufgeführt ist, für die Datenverarbeitung, Integration und Auswertung genutzt:

Tabelle 8-2: Eingesetzte Software

Software	Version
Microsoft® Office Excel®	2007 SP3 MSO
MATLAB®	7.8.0.347 (R2009a)
K.I.S.S.	1.0 vom 22.04.1996

Tabelle 8-3: Übersicht der Kapillarelektrophorese-Systemen

Kapillarelektrophorese	Hersteller	Software	Detektor	Kapillarlänge	
				Totale Länge	Effektive Länge
UniCAM Crystal 310 CE System 1	UniCAM Ltd, Cambridge, Großbritannien	Crystal CE program V.1.3.	Spectra 100 UV-Detektor (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA),	0.58 m	0.48 m
UniCAM Crystal 310 CE System 2	UniCAM Ltd, Cambridge, Großbritannien	DAX Data Acquisition & Analysis Version 8.0	Spectra 100 UV-Detektor	0.58 m	0.48 m
PrinCE 550 CE	Prince Technologies, Emmen, Niederlande	DAX Data Acquisition & Analysis Version 8.0	Lambda 1010 UV-Detektor (Bischoff, Leonberg, Germany)	0.85 m	0.31 m 0.54 m
HP ^{3D} CE System	Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland	HP ChemStation ^{Plus} (Rev. A.06.03)	Diodenarray-Detektor	variabel	
Agilent CE 1600 System	Agilent, Waldbronn, Deutschland	Chemstation ^{Plus} (Rev. A.08.03)	Diodenarray-Detektor	variabel	

8.2.1 Datenauswertung

Die Daten der verschiedenen CE-Systeme wurde nach dem Fließschema in Abbildung 8-1 verarbeitet. Zuerst wurden die CE-Rohdaten je nach CE-Steuerungssoftware in ein Format gespeichert, das Zeit und Absorption in Tabellenform erfasste. Mithilfe von Kissvorbereitung (Abbildung 8-2) konnte jede der exportierten Tabellen in MATLAB® weiterbearbeitet werden. Dafür öffnete man jede Datei durch Markieren des Dateinamens und Plottens. Danach kann das Elektropherogramm visuell im Plot beurteilt werden. Da eine Integration mit K.I.S.S. nur mit Elektropherogrammen, die kürzer als 60 min sind, durchgeführt werden kann, besitzt Kissvorbereitung die Möglichkeit, durch Eintragen einer Anfangs- und Endzeit das Elektropherogramm zu schneiden. Damit die Datei für KISS lesbar ist, müssen die Daten im Format *.ced gespeichert werden. Zur Erleichterung bei der Bearbeitung von vielen Datensätzen kann durch Drücken des Buttons „Dateiname“ bereits aus dem ursprünglichen Namen der Name mit benötigter Endung entstehen. Mit Klick auf Speichern wird die bearbeitete Datei mit neuer Endung im Ursprungsordner gespeichert.

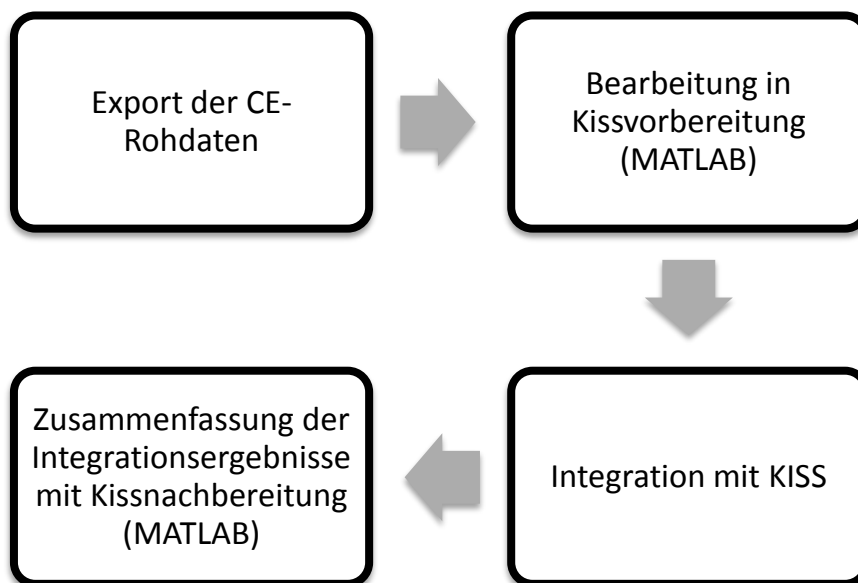


Abbildung 8-1: Arbeitsablauf der Datenauswertung

Wenn alle Dateien eines Ordners bearbeitet sind, können die Dateien mit KISS integriert werden. Während der Integration entstehen sogenannte Ergebnisdateien (*.erg), die die im Programm angezeigten Informationen z.B. zu Migrationszeit und Peakfläche enthalten. In MATLAB können die Ergebnisdateien mithilfe von Kissnachbereitung zusammengefasst werden (Abbildung 8-3). Der Ordner mit allen benötigten Ergebnisdateien wird geöffnet. Durch Anwählen von Migrationszeit oder Peakflächen und Plot kann man sich einen ersten Überblick über die Ergebnisse verschaffen.

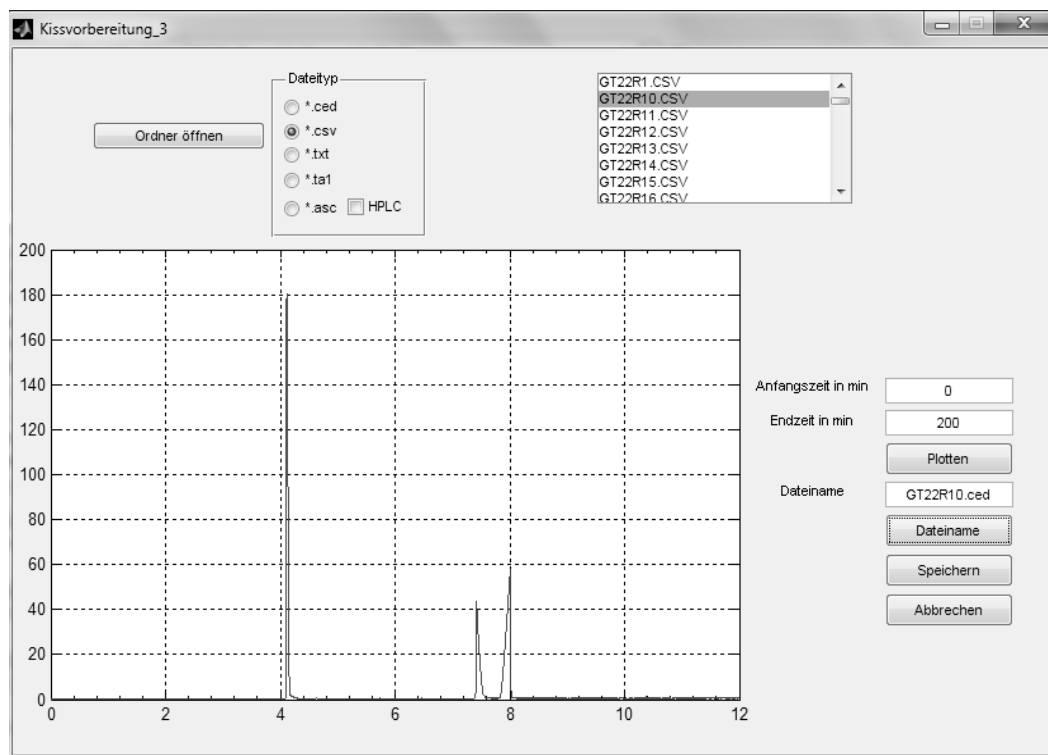


Abbildung 8-2: Kissvorbereitung

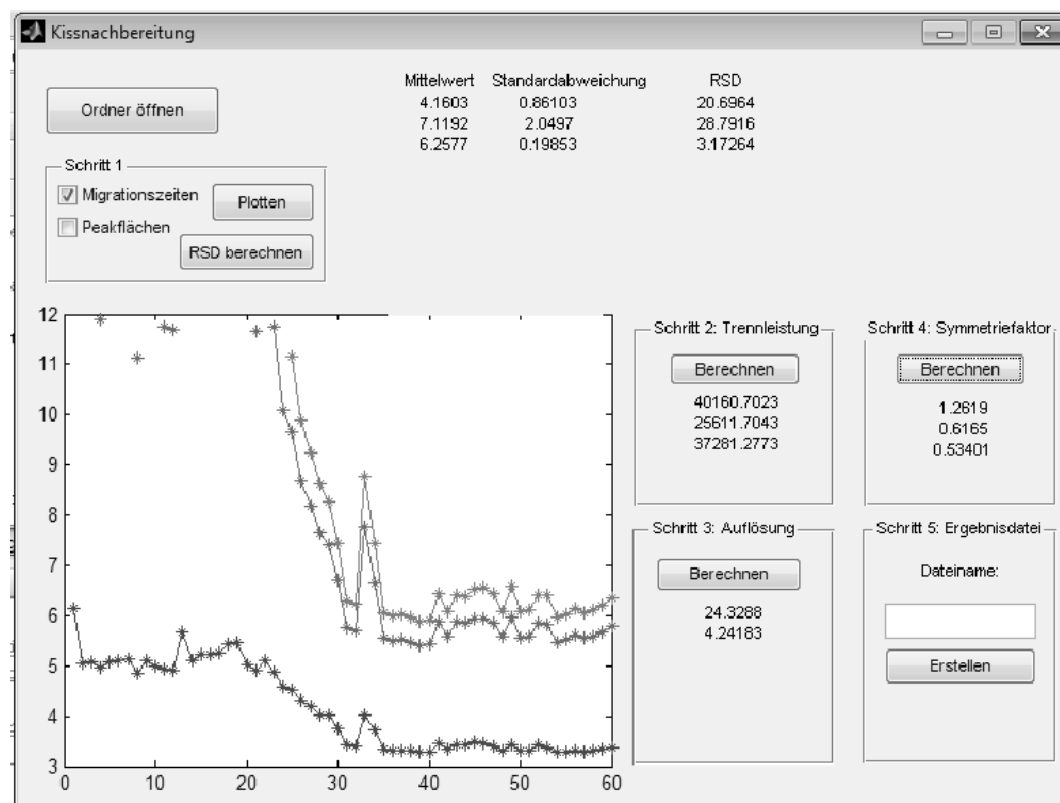


Abbildung 8-3: Kissnachbereitung

Dabei werden die Ergebnisdateien nach Dateinamen sortiert, durchnummeriert und für jeden dokumentierten Peak das Ergebnis geplottet. Mit der Berechnung von RSD, Trennleistung,

Auflösung und Symmetriefaktor lassen sich zusätzliche Informationen anzeigen. Unter Schritt 5 kann ein Name für die Zusammenfassung aller Daten eingetragen werden und mit Klick auf „Erstellen“ eine Excel-Mappe erstellt werden. Diese beinhaltet alle Integrationsdaten und weitere Auswertungen können innerhalb dieser Mappe erfolgen.

8.3 Temperaturmessung an der Kapillare

8.3.1 Ausrüstung und Materialien

Das Infrarotthermometer war ein optris® CT LT20 mit einer CF-Optik (Optris, Berlin, Deutschland). Dazu wurde die Software CompactConnect 1.6.1 (Optris, Berlin, Deutschland) geliefert und auch genutzt. Die für den Puffer benötigten Substanzen Borsäure, Essigsäure, Natriumacetat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat und Natriumtetraborat-Decahydrat wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bzw. Natriumhydroxid von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in analytischer Qualität bezogen. Als EOF-Marker wurde Acetanilid genutzt, ebenfalls von Merck (Darmstadt, Deutschland) in analytischer Qualität. Die Proteine Myoglobin und Ovalbumin, die für eine Beispieltrennung benötigt wurden, wurden von Sigma-Aldrich in analytischer Qualität bezogen. Die schwarze Farbe, die für die Bestimmung des Emissionsgrades der Kapillaren benötigt wurde, war handelsübliche matte Sprühfarbe.

8.3.2 Puffer- und Probenherstellung

15 Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Molaritäten wurden aus den in 8.3.1 genannten Substanzen hergestellt. Dafür wurden die Substanzen nach Tabelle 8-4 eingewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst. Falls nötig, wurde der pH-Wert des Puffers mit einer Lösung, die 1 mol/l Natriumhydroxid enthielt, justiert. Die Pufferlösung wurde auf 100,0 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Je nachdem welcher Puffer für die Testserie genutzt wurde, wurde das Acetanilid in diesem Puffer in einer Konzentration von 1-2 mg/ml gelöst. Myoglobin (Konzentration 1 mg/ml), Ovalbumin (2 mg/ml) und Acetanilid (1 mg/ml) wurden im Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 8) gelöst und für eine Beispieltrennung eingesetzt.

Tabelle 8-4: Angaben für die Puffersysteme nach Referenz [20], jeweils für 100 ml Puffer berechnet

pH	Molarität [mmol L ⁻¹]	Puffersystem	Säure	Base
Acetatpuffer				
			1 M CH ₃ COOH	CH ₃ COONa
4.5	100		6.35 ml	291.0 mg
5.0	100		3.55 ml	529.3 mg
5.5	100		1.48 ml	698.5 mg
Phosphatpuffer				
			NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
6.0	50		545.8 mg	51.6 mg
6.0	100		1091.6 mg	103.2 mg
6.5	100		970.6 mg	290.5 mg
7.0	50		358.8 mg	339.4 mg
7.0	100		717.6 mg	678.7 mg
7.5	100		393.2 mg	1176.5 mg
8.0	20		32.36 mg	306.34 mg
8.0	100		161.8 mg	1531.7 mg
Boratpuffer				
			H ₃ BO ₃	Na ₂ B ₄ O ₇ * 10 H ₂ O
8.0	100		534.8 mg	128.8 mg
8.5	100		387.8 mg	355.3 mg
9.0	100		98.8 mg	801.0 mg
			Na ₂ B ₄ O ₇ * 10 H ₂ O	0.1 M NaOH
9.5	100		618.3 mg	69.6 ml
10.0	100		618.3 mg	87.9 ml

8.3.3 Methoden

Temperaturen wurden an einer PrinCE 550 CE und einer Agilent CE 1600 System (siehe auch Kapitel 8.1) gemessen. Verschiedene Kapillaren wurden von Polymicro Technologies

(Phoenix, AZ, USA) bezogen. Mit linearem Polyacrylamid beschichtete Kapillaren hatten einen Innendurchmesser von 75 μm und einen Außendurchmesser von 375 μm . Kapillaren vom Typ „bare-fused silica“ wurden mit Innendurchmessern von 25, 50 und 75 μm und jeweils einem Außendurchmesser von 375 μm genutzt. Die totale und die effektive Länge der Kapillaren betrugen 85 bzw. 31 cm in der PrinCE 550 CE. Die totalen Kapillarlängen in der Agilent 1600 CE wurden im Bereich von 38 – 80 cm variiert, die effektive Kapillarlänge war immer um 8 cm kürzer als die totale Länge.

Jede neue Kapillare vom Typ „bare-fused silica“ wurde mit 1 molarer Natriumhydroxid-Lösung für 30 min bei einem Druck von 1200 mbar und einer Temperatur von 40°C konditioniert. Im nächsten Schritt wurde die Kapillare mit dem Puffer gespült, der nach der Konditionierung als Trennpuffer genutzt wurde. Dieser Spülschritt wurde mit 1200 mbar bei einer Temperatur von 23°C für 30 min durchgeführt. Als letztes wurde die Kapillare mit der gleichen Pufferlösung für 120 min bei 30 kV equilibriert.

Vor jeder Messung wurde die Kapillare für 2 min bei 1500 mbar mit dem Puffer gespült, der danach zum Einsatz kommen sollte. Die Probe wurde hydrodynamisch injiziert. Hierzu wurde bei einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 25 oder 50 μm ein Druck von 50 mbar für 10 s angelegt. Für Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 μm wurde die Injektion 3 s bei 25 mbar durchgeführt. Die Spannung während der Trennung wurde zwischen zwei Puffervials angelegt und variierte in den Versuchen von 5 – 30 kV. Eine Trennung dauerte solange bis der Peak des EOF-Markers auftauchte, aber maximal 60 min. Bei allen Trennungen war eine Temperatur von 23°C eingestellt, außer es steht etwas anderes beschrieben.

8.3.4 Bestimmung des Emissionsgrades von Kapillaren

Mehrere Kapillaren wurden mit Klebestreifen zu einem Bündel zusammengefasst. Ein Teil des Bündels wurde mit matter, schwarzer Farbe flächig besprüht. Wie in Referenz [108] beschrieben wurde der Emissionsgrad ε im IR-Thermometer auf 0,98 eingestellt und die Temperatur der schwarzen Kapillaren gemessen. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur des nicht besprühten Bereiches gemessen. Der Emissionsgrad wurde so verändert, dass die Temperatur beider Bereiche die gleiche ist. Der so eingestellte Emissionsgrad wurde danach noch mit der Tabelle aus Referenz [108] verglichen.

8.4 Qualifizierung analytischer Instrumente

8.4.1 Materialien

Das Protokoll der Qualifizierung wurde an allen fünf Kapillarelektrophorese-Systemen getestet, die in Tabelle 8-1 spezifiziert sind. Kapillaren vom Typ „bare fused silica“ mit einem Innendurchmesser von 50 µm und einem Außendurchmesser von 375 µm wurden von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) bezogen. Die Kapillarlängen wurde nach den Anforderungen der CE-Systeme ausgewählt, wie sie in Tabelle 8-1 spezifiziert sind. Für die variablen Systeme von Agilent bzw. Hewlett-Packard werden die Kapillarlängen in den einzelnen Prüfmethoden in Kapitel 4.2 beschrieben. Das Detektionsfenster und die Kapillarenden wurden mit einem Feuerzeug eingebrannt und mit Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) gesäubert. Borsäure, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Acetanilid wurden ebenfalls von Merck (Darmstadt, Deutschland), sowie Natriumhydroxid, Paracetamol, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Alle Lösungen wurden durch Membranfilter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm gefiltert. Alle Chemikalien waren von analytischem Grad.

8.4.2 Puffer- und Probenherstellung

Für die Qualifizierung werden ein Boratpuffer (0,1 mol/l, pH 8,5) und zwei Phosphatpuffer (0,1 mol/l und 0,05 mol/l, pH 7,0) benötigt. In 0,1 l bidestilliertem Wasser werden 6,183 g Borsäure gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit einer frisch präparierten, wässrigen 1 molaren Natriumhydroxid-Lösung auf 8,5 eingestellt. Danach wird der Puffer auf 1 l mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die beiden Phosphatpuffer wurden bereits in Kapitel 8.3.2 vorgestellt.

Für die Probe werden 0,09 g Paracetamol, 0,06 g 3,5-Dihydroxybenzoesäure und 0,12 g Nicotinsäure eingewogen und mit dem obenstehenden Boratpuffer auf 0,1 l aufgefüllt. Im Detektorlinearitätstest werden drei verschiedene Proben benötigt, die in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l verteilt liegen sollten. Für den Test auf Spannungsrichtigkeit wird Paracetamol gegen den EOF-Marker Acetanilid mit der Einwaage 0,1 g getauscht.

8.4.3 Methoden

8.4.3.1 Gerätetest

Die Qualifizierungsprozedur basiert auf der Methode nach Referenz [134] und zusätzlichen Tests. In Tabelle 4-1 werden alle benötigten Methoden für die einzelnen Parametertestungen vorgestellt. Nachfolgend ist die Kapillarzonenoelektrophorese-Methode beschrieben, die als Standardmethode für die meisten Parametertestungen genutzt wird.

Neue Kapillaren werden für 30 min mit einer wässrigen, 1 molaren Natriumhydroxid-Lösung bei 1200 mbar und 40°C konditioniert. Im zweiten Schritt wird die Kapillare für 30 min bei 1200 mbar und 20°C mit dem Puffer gespült, der im Test danach genutzt wird. Zusätzlich wird die Kapillare mit dem Puffer für 120 min bei 30 kV equilibriert. Vor jeder Trennung wird die Kapillare für 2 min bei 1500 mbar mit dem nachfolgend genutzten Puffer gespült. Die Probe wird hydrodynamisch bei 50 mbar für 0,1 min einbringen. Während der Trennung wird 25 kV als Spannung angelegt. Typischerweise dauert die Trennung 10 min, dies ist jedoch von der Kapillarlänge abhängig. Die Detektionswellenlänge wird auf 254 nm eingestellt. Falls es im Test von Vorteil ist, kann ein vorhandener Diodenarraydetektor eingesetzt werden, um mehrere Wellenlängen gleichzeitig und/oder ganze Spektren aufzunehmen.

8.4.3.2 Prüfung auf Wellenlängenrichtigkeit ohne Diodenarraydetektor

Falls kein DAD zur Verfügung steht, können für die Prüfung auf Wellenlängenrichtigkeit mehrere Elektropherogramme bei verschiedenen Wellenlängen aufgezeichnet werden. Als Probe wird die oben beschriebene Mischung aus Paracetamol, 3,5-Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure injiziert. Tabelle 8-5 zeigt die Messbereiche für die einzelnen Maxima. Es wird daraus deutlich, dass man den kompletten Bereich von 200-310 nm mit diesen Substanzen abdeckt und auch für den kompletten Bereich Elektropherogramme anfertigen muss. Die Wellenlänge sollte in 2 nm-Schritten eingestellt werden, in einem Bereich von ± 3 nm um das Maximum herum sogar in 1 nm-Schritten. Abbildung 10-1 zeigt die resultierenden Spektren.

Tabelle 8-5: Messbereiche für die Prüfung auf Wellenlängenrichtigkeit ohne Diodenarraydetektor

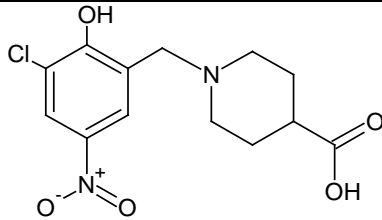
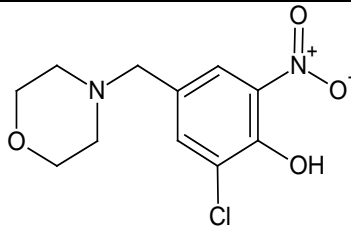
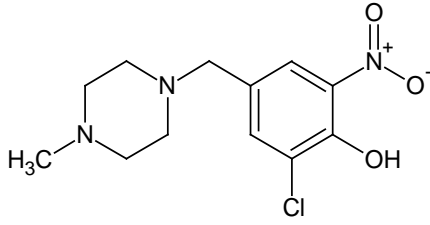
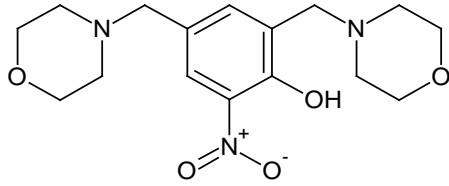
Substanz	Maximum	Messbereich
Paracetamol	245 nm	230-260 nm
3,5-Dihydroxybenzoesäure	297,5 nm	280-310 nm
Nicotinsäure	213 nm	200-230 nm
	264 nm	250-280 nm
	270 nm	255-285 nm

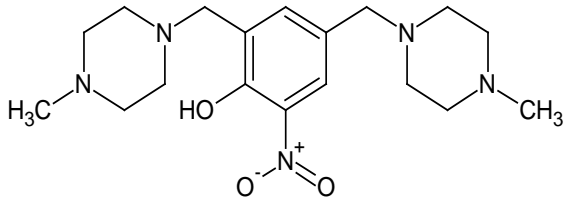
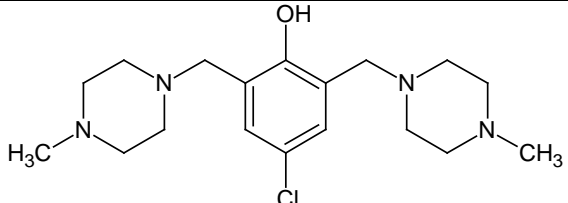
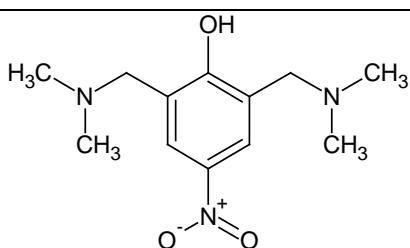
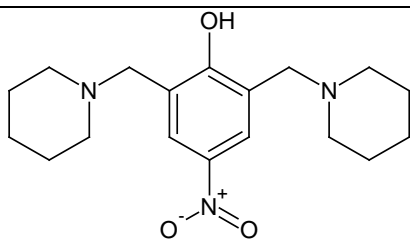
8.5 Kapillarisoelektrische Fokussierung

8.5.1 Materialien

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Natriumhydroxid, konzentrierte Salzsäure, Phosphorsäure, Glukose und Tween 20 wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in analytischer Qualität bezogen. Pharmalyte™ 3-10 for isoelectric focusing wurde bei GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden) gekauft. Pharmalyte™ 5-8 for isoelectric focusing wurde von dem Vorgängerunternehmen Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Schweden) bezogen. Beide Ampholytlösungen haben 0,36 meq/ml pH. Die isoelektrischen Punktmarker (IEP-Marker), zusammengefasst in Tabelle 8-6, wurden von Dr. M. Minárik zur Verfügung gestellt. Als Probe wurde die Cohn-Fraktion IV-4 genutzt, die α - und β -Globuline, Transferrin, Haptoglobin und Coeruloplasmin aus Plasma enthält [152]. Diese Fraktion wurde von Prof. Schlüter zur Verfügung gestellt.

Tabelle 8-6: Strukturformeln der IEP-Marker

IEP-Marker 3,9 M_r 314,08	
IEP-Marker 5,3 M_r 272,06	
IEP-Marker 6,4 M_r 285,09	
IEP-Marker 7,5 M_r 337,17	

IEP-Marker 8,5 M_r 363,23	
IEP-Marker 9,0 M_r 352,20	
IEP-Marker 9,6 M_r 253,30	
IEP-Marker 10,4 M_r 333,43	

8.5.2 Puffer- und Probenherstellung

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Für die Stammlösung der Ampholyte wurden 0,4 g HPMC in wenigen Milliliter Wasser suspendiert. Die Suspension wurde auf einem Magnetrührer auf niedriger Stufe gerührt, währenddessen quoll sie. 1 ml Pharmalyte wurde in der HPMC-Lösung gelöst und diese dann auf 25 ml mit Wasser aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:2 mit Wasser verdünnt, so dass Endkonzentrationen in der Blindlösung der Ampholyte von 2% (V/V) und der HPMC von 0,85 (m/V) entstanden. Als Anolyt diente Phosphorsäure mit einer Konzentration von 10 mmol/l bzw. 1,15 g/l. Der Katholyt war Natriumhydroxid in einer Konzentration von 20 mmol/l bzw. 0,8 g/l. Eine isoosmotische Natriumchlorid-Lösung wurde als Spülreagenz eingesetzt. Diese enthielt 0,9 g Natriumchlorid in 100 ml Wasser. Das zweite Spülreagenz war eine Lösung, die 3 mol/l Salzsäure enthielt. 29,6 g konzentrierte Salzsäure (37% m/m) wurden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Um die Proteine zu lösen, wurde eine Lösung hergestellt, die 5 g Glukose und 1 g Tween 20 auf 100 ml Wasser enthielt. 10 mg der

Proteine wurden in einen 5 ml Messkolben eingewogen und mit der eben beschriebenen Lösung bis 5,0 ml aufgefüllt. Die Proteinlösung wurde mit 5 ml der Ampholytstammlösung gemischt. Zusätzlich wurden 30 µl von einer oder mehreren IEP-Markerlösungen hinzugefügt.

8.5.3 Methode

Die isoelektrische Fokussierung wurde an einer PrinCE 550 CE durchgeführt (siehe auch Kapitel 8.1). Kapillaren mit einer Beschichtung aus linearem Polyacrylamid wurden von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) bezogen. Die Gesamtlänge der Kapillare betrug während der Versuche immer 85 cm mit einer effektiven Länge von 31 oder 54 cm. Alle Trennungen wurden bei 23°C ausgeführt. Die Trennungen wurden mit dem angeschlossenen Detektor bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. In den meisten Fällen wurde eine Wellenlänge von 280 nm genutzt. Tabelle 8-7 fasst alle Schritte der Methode zusammen. Eine Konditionierung einer neuen Kapillare bzw. eine Spülung zu Beginn des Tages bestand aus den Spülschritten 4-7 aus Tabelle 8-6, bevor mit den eigentlichen Analysen begonnen wurde.

Tabelle 8-7: Methode zur cIEF

	Inlet	Outlet	Druck [mbar]	Spannung [kV]	Dauer [min]
1	Blindlösung	leer	1030	-	4
2	Probe	leer	1030	-	variabel
3	10 mM H ₃ PO ₄	20 mM NaOH	-	30	variabel
4	NaCl	leer	2000	-	5
5	3 M HCl	leer	1030	-	5
6	Wasser	leer	1030	-	20
7	Blindlösung	leer	1030	-	5

8.6 Kapillargelelektrophorese

8.6.1 Materialien

SDS-MW-Gelpuffer (Artikelnummer: A30341) wurde von Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) bezogen. Weitere Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in analytischer Qualität bezogen. Benötigt wurden Natriumhydroxid, konzentrierte Salzsäure, Trizma® Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris), Natriumdodecylsulfat und DL-Dithiothreitol (DTT). Die als Standard verwendeten Proteine Myoglobin, Carboanhydrase I, Ovalbumin und bovines Serumalbumin wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich in analytischer Qualität bezogen.

Tabelle 8-8: Molekularmassen und isoelektrische Punkte der verwendeten Proteine [170, 171]

Protein	M _r [Da]	pI
Myoglobin aus dem Pferdeherz	17083	6,8 / 7,2
Carboanhydrase I von humanen Erythrozyten	28870	6,6
Ovalbumin aus dem Hühnerei	42881	5,1
Serumalbumin vom Rind (BSA)	66463	5,8

Der Modelantikörper aus Kapitel 6.7 wurde von einem pharmazeutischen Unternehmen zur Verfügung gestellt. Der monoklonale Antikörper gehört zur Klasse der IgG1-Antikörper und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die mit Disulfidbrücken verbunden sind [169].

8.6.2 Puffer- und Probenherstellung

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Als Spülreagenzien für die CE-Methode wurden eine Natriumhydroxid-Lösung (0,1 mol/l bzw. 4 g/l) und eine Salzsäure-Lösung (0,1 mol/l bzw. 10,3 g/l) benötigt. Für die Probe wurde ein Tris-HCl-Puffer pH 8 mit 1% (m/m) SDS hergestellt. Dafür wurden 1,21 g Tris-Base eingewogen und in 50 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde dann mit einer 1 mol/l Salzsäure-Lösung auf pH 8,0 mithilfe eines pH-Meters eingestellt. Erst danach wurde 1 g SDS hinzu gewogen und auf 100 ml aufgefüllt. Für die verschiedenen Experimente wurden verschiedene Proteinkonzentrationen benötigt; Tabelle 8-8 gibt Auskunft über die genutzten Konzentrationen.

Tabelle 8-9: Konzentrationen der Analyten in den verschiedenen Versuchen

Protein	Konzentration während der Methodenoptimierung [mg/ml]	Konzentrationen für die Linearitätstestung [mg/ml]
Myoglobin	1,0	0,7 – 1,0 – 1,4 – 2,2 – 2,8
Carboanhydrase I	0,5	
Ovalbumin	1,0 – 1,5	0,8 – 0,9 – 1,6 – 2,2 – 3,0
BSA	1,0 – 1,5	0,5 – 0,8 – 1,1 – 1,8 – 3,4
Antikörper	0,8	

Der Antikörper wurde in nicht-reduzierter und in teilweise reduzierter Form vermessen. Für die Reduzierung wurden 0,31 g DTT in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst, die Endkonzentration betrug dann 0,2 mol/l.

8.6.3 Methode

Durchgeführt wurde die Kapillargelelektrophorese an einem Agilent 1600 CE System (siehe auch Kapitel 8.1). Kapillaren vom Typ „bare fused silica“ wurden von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) bezogen. Die Gesamtlänge der Kapillare betrug während der Versuche immer 33 cm mit einer effektiven Länge von 24.5 cm. Die Kapillare wurde während der Versuche auf 25°C temperiert. Bei einer Wellenlänge von 220 nm wurde mit dem eingebauten Detektor die Trennung aufgenommen. Tabelle 8-9 beschreibt die aus Referenz [157] transferierte Methode. In Kapitel 6.2 wird die Optimierung dieser Methode erläutert.

Tabelle 8-10: Methode zur Kapillargelelektrophorese

Konditionierung				
Einlass	Auslass	Druck [bar]	Spannung [kV]	Zeit
0,1 mol/l Natriumhydroxid	Wasser	2		10 min
0,1mol/l Salzsäure	Wasser	2		5 min
Wasser	Wasser	2		2 min
SDS-MW-Gelpuffer	Wasser	4		10 min
In Wasser eintauchen				1x
SDS-MW-Gelpuffer	SDS-MW-Gelpuffer		-16,5	10 min
Trennung				
Einlass	Auslass	Druck [bar]	Spannung [kV]	Zeit
Probe	Wasser		-5,0	20 sec
SDS-MW-Gelpuffer	SDS-MW-Gelpuffer		-16,5	variabel
Spülprozedur				
Einlass	Auslass	Druck [bar]	Spannung [kV]	Zeit
0,1 mol/l Natriumhydroxid	Wasser	4		3 min
0,1mol/l Salzsäure	Wasser	4		1 min
Wasser	Wasser	4		1 min
SDS-MW-Gelpuffer	Wasser	4		10 min
In H ₂ O eintauchen				2x
abschließende Spülprozedur				
Einlass	Auslass	Druck [bar]	Spannung [kV]	Zeit
0,1 mol/l Natriumhydroxid	Wasser	4		15 min
0,1mol/l Salzsäure	Wasser	3,5		5 min
Wasser	Wasser	3,5		10 min

Änderungen wurden nur bei der Injektion durchgeführt, die Parameter für die Trennung und die Spülprozeduren wurden beibehalten. Die Injektionszeit, -spannung bzw. -druck und -

modus wurden variiert, sowie die Konzentration von Ovalbumin und BSA auf 1,5 mg/ml erhöht. Tabelle 8-10 fasst die Variationen zusammen. Für den Vergleich der Injektionsarten in Kapitel 6.3 wurden die Kombinationen elektrokinetisch, 30 sec und -10 kV und hydrodynamisch, 240 sec und 50 mbar genutzt.

Tabelle 8-11: Variationen der Injektion

Injektionsmodus	Injektionszeit [sec]	Druck/Spannung
Elektrokinetisch	20	-5 kV
	20	-10 kV
	30	-5 kV
	30	-10 kV
Hydrodynamisch	30	1 bar (Spül Druck)
	60	1 bar (Spül Druck)
	120	50 mbar (Injektionsdruck)
	240	50 mbar (Injektionsdruck)

9 Literatur

1. Tiselius, A., *Trans. Faraday Soc.* 1937, 33, 524, 10.1039/tf9373300524.
2. Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., *Eur Pharm Rev.* 2007, *Industry focus*, 46–47.
3. Fabre, H., Altria, K. D., *LC GC Europe.* 2001, 14 (5), 302, 304, 306, 308-310.
4. Wätzig, H., *Pharmazeutische Industrie.* 2002, 64 (11), 1183–1185.
5. van Eeckhaut, A., Michotte, Y. (Eds.), *Chiral separations by capillary electrophoresis*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, Fla. 2010.
6. Servais, A.-C., Crommen, J., Fillet, M., Factors influencing Cyclodextrin-mediated Chiral Separations, in: van Eeckhaut, A., Michotte, Y. (Eds.), *Chiral separations by capillary electrophoresis*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, Fla. 2010, pp. 87–107.
7. Hasemann, P., Leistungsfähigkeit von MEKC-Methoden und chiralen Trennungen mittels Kapillarelektrophorese: *Entwicklung, Validierung und Anwendung kapillarelektrophoretischer Methoden*, Dissertation, Braunschweig 2011.
8. Guo, A., Camblin, G., Han, M., Meert, C., Park, S., Role of CE in Biopharmaceutical Development and Quality Control, in: Ahuja, S., Jimidar, M. I. (Eds.), *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*, Elsevier/AP, Amsterdam 2008, pp. 357–400.
9. El Deeb, S., Wätzig, H., El-Hady, D., *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2013, 48, 112–131, 10.1016/j.trac.2013.04.005.
10. Strege, M. A., Lagu, A. L., *Electrophoresis.* 1997, 18 (12-13), 2343–2352, 10.1002/elps.1150181225.
11. Choudhary, G., Chakel, J. A., Hancock, W. S., Torres-Duarte, A., McMahon, G., Wainer, I., *Anal Chem.* 1999, 71, 855–859.
12. Mischak, H., Schanstra, J. P., *Prot. Clin. Appl.* 2011, 5 (1-2), 9–23, 10.1002/prca.201000058.
13. Mischak, H., Coon, J. J., Novak, J., Weissinger, E. M., Schanstra, J. P., Dominiczak, A. F., *Mass Spectrom. Rev.* 2009, 28 (5), 703–724, 10.1002/mas.20205.
14. Crowley, T. A., Hayes, M. A., *Proteomics.* 2005, 5 (14), 3798–3804, 10.1002/pmic.200401212.
15. Rabanes, H. R., Guidote, A. M., Quirino, J. P., *Electrophoresis.* 2012, 33 (1), 180–195, 10.1002/elps.201100223.
16. Kan, C.-W., Fredlake, C. P., Doherty, E. A. S., Barron, A. E., *Electrophoresis.* 2004, 25 (21-22), 3564–3588, 10.1002/elps.200406161.

17. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden ; mit 81 Tabellen*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 2008.
18. Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y., *Electrophoresis*. 2006, 27, 2283–2292.
19. Mayer, B. X., Müller, M., Altria, K. D., *LC GC Europe*. 2001, 14 (1), 19–25.
20. Wätzig, H., Degenhardt, M., Kunkel, A., *Electrophoresis*. 1998, 19, 2695–2752.
21. Altria, K. D., *LC GC Europe*. 2002 (September), 1–5.
22. Altria, K. D., *The Column*. 2010, 6 (20), 10–11.
23. Nunnally, B., Park, S., Patel, K., Hong, M., Zhang, X., Wang, S.-X., Renner, B., Reed-Bogan, A., Salas-Solano, O., Lau, W., Girard, M., Carnegie, H., Garcia-Cañas, V., Cheng, K. C., Zeng, M., Ruesch, M. N., Frazier, R., Jochheim, C., Natarajan, K., Jessop, K. M., Saeed, M., Moffatt, F., Madren, S., Thiam, S., Altria, K. D., *Chromatographia*. 2006, 64, 359–368.
24. Nunnally, B., Park, S., Patel, K., Hong, M., Zhang, X., Wang, S.-X., Renner, B., Reed-Bogan, A., Salas-Solano, O., Lau, W., Girard, M., Carnegie, H., Garcia-Cañas, V., Cheng, K. C., Zeng, M., Ruesch, M. N., Frazier, R., Jochheim, C., Natarajan, K., Jessop, K. M., Saeed, M., Moffatt, F., Madren, S., Thiam, S., Altria, K. D., *Chromatographia*. 2007, 66, 955–961.
25. Europäisches Arzneibuch, Allgemeiner Teil, Monographiegruppen, Dt. Apotheker-Verl, Stuttgart 2011.
26. The United States pharmacopeia, the national formulary: *USP ; NF*, US Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, Md 1979-.
27. Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., El Deeb, S., Kühn, N., Reichl, S., Limberger, M., Watt, S., Wätzig, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, 71, 127–138, 10.1016/j.jpba.2012.08.024.
28. El Deeb, S., *High Efficiency Separation Techniques: Fast HPLC Using Monolithic Silica Columns and Chiral Separation Using Capillary Zone Electrophoresis*, Dissertation, Braunschweig 2007.
29. Rustandi, R. R., Washabaugh, M. W., Wang, Y., *Electrophoresis*. 2008, 29 (17), 3612–3620, 10.1002/elps.200700958.
30. 2.2.47 Kapillarelektrophorese, in: *Europäisches Arzneibuch, Allgemeiner Teil, Monographiegruppen*, Dt. Apotheker-Verl, Stuttgart 2011.
31. 2.2.46 Chromatographische Trennmethode, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, Monographiegruppen*, Dt. Apotheker-Verl, Stuttgart 2011.

-
32. Analytical Instrument Qualification, in: *The United States pharmacopeia, the national formulary: USP ; NF*, US Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, Md 1979-.
 33. Jungblut, P. R., Schlüter, H., *Biospektrum*. 2008, 14, 37–40.
 34. Schröder, S., Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Dissertation, Braunschweig 2009.
 35. Zhu, Z., Lu, J. J., Liu, S., *Anal. Chim. Acta*. 2012, 709, 21–31, 10.1016/j.aca.2011.10.022.
 36. Graf, M., Analytik von Proteinen in der Kapillarelektrophorese, Dissertation, Braunschweig 2006.
 37. Guttman, A., Schwartz, H. E., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2279–2283.
 38. Bohlin, M. E., Johannesson, I., Carlsson, G., Heegaard, N. H. H., Blomberg, L. G., *Electrophoresis*. 2012, 33 (12), 1695–1702.
 39. Righetti, P. G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis*. 2001, 22 (4), 603–611.
 40. Stutz, H., *Electrophoresis*. 2009, 30, 2032–2061.
 41. Suratman, A., Wätzig, H., *J. Sep. Sci.* 2008, 31 (10), 1834–1840.
 42. Hjertén, S., *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191–198.
 43. Schomburg, G., Coated capillaries in high-performance capillary electrophoresis, in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-performance capillary electrophoresis: Theory, techniques, and applications*, Wiley, New York 1998, pp. 481–523.
 44. Graf, M., García, R. G., Wätzig, H., *Electrophoresis*. 2005, 26 (12), 2409–2417, 10.1002/elps.200410360.
 45. Felhofer, J. L., Blanes, L., Garcia, C. D., *Electrophoresis*. 2010, 31 (15), 2469–2486, 10.1002/elps.201000203.
 46. García-Campaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis*. 2007, 28 (1-2), 208–232, 10.1002/elps.200500790.
 47. Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30 (6), 1096–1120, 10.1002/mas.20313.
 48. Beckman Coulter.
 49. Sängler-Van de Griend, C. E., General considerations to improve performance of CE methods, in: Ahuja, S., Jimidar, M. I. (Eds.), *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*, Elsevier/AP, Amsterdam 2008, pp. 123–144.
 50. Agilent Technologies, High-sensitivity detection cell for the Agilent Capillary Electrophoresis system, 5989-9808EN 2008.
 51. Agilent Technologies, Diode-array detection in capillary electrophoresis using Agilent Extended Light Path capillaries, 5990-3410EN 2009.

-
52. Malá, Z., Šlampová, A., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis*. 2009, 30 (1), 215–229, 10.1002/elps.200800433.
 53. Xu, X., Kok, W. T., Poppe, H., *J. Chromatogr. A*. 1997, 786, 333–345.
 54. Meyer, C., Seiler, P., Bies, C., Cianciulli, C., Wätzig, H., Meyer, V. R., *Electrophoresis*. 2012, 33, 1509–1516.
 55. Hunnius, C., Ammon, H. P. T., Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, de Gruyter, Berlin [u.a.] 2004.
 56. Kühne, S., Einführung in die Kapillarelektrophorese 2010.
 57. Stuart, H. A., Klages, G., Kurzes Lehrbuch der Physik, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2006.
 58. Knox, J. H., McCormack, K. A., *Chromatographia*. 1994, 38 (3/4), 207–214.
 59. Petersen, N. J., Nikolajsen, R. P. H., Mogensen, K. B., Kutter, J. P., *Electrophoresis*. 2004, 25, 253–269.
 60. Evenhuis, C. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis*. 2009, 30, 897–909, 10.1002/elps.200800643.
 61. Xuan, X., Xu, B., Sinton, D., Li, D., *Lab Chip*. 2004, 4, 230–236.
 62. Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Anal Chem*. 2006, 78, 2684–2693, 10.1021/ac052075x.
 63. Ikuta, N., Yamada, Y., Hirokawa, T., *Electrophoresis*. 2000, 21, 360–366.
 64. Cifuentes, A., Kok, W. T., Poppe, H., *J. Microcolumn Separations*. 1995, 7 (4), 365–374.
 65. Knox, J. H., McCormack, K. A., *Chromatographia*. 1994, 38 (5/6), 279–282.
 66. Giordano, B. C., Horsman, K. M., Burgi, D. S., Ferrance, J. P., Landers, J. P., *Electrophoresis*. 2006, 27, 1355–1362.
 67. Fu, L.-M., Wang, J.-H., Luo, W.-B., Lin, C.-H., *Microfluid. Nanofluidics*. 2009, 6, 499–507, 10.1007/s10404-008-0328-y.
 68. Gui, L., Ren, C. L., *Appl. Phys. Lett.* 2008, 92, 24102.
 69. Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis*. 2005, 26, 4333–4344.
 70. Evenhuis, C. J., Musheev, M. U., Krylov, S. N., *Anal Chem*. 2011, 83 (5), 1808–1814, 10.1021/ac103216s.
 71. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal Chem*. 1981, 53 (8), 1298–1302.
 72. Monographien A - J, Dt. Apotheker-Verl, Stuttgart 2011.
 73. Suntornsuk, L., *Anal Bioanal Chem*. 2010, 398 (1), 29–52, 10.1007/s00216-010-3741-5.
 74. Lunn, G., Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis, Wiley, New York 2000.
-

-
75. Šlampová, A., Malá, Z., Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis*. 2013, 34 (1), 3–18, 10.1002/elps.201200346.
76. Malá, Z., Křivánková, L., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis*. 2007, 28 (1-2), 243–253, 10.1002/elps.200600397.
77. Hjertén, S., Zhu, M.-D., *J. Chromatogr.* 1985, 346, 265–270.
78. Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A*. 2004 (1037), 491–499, 10.1016/j.chroma.2003.11.025.
79. Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Zhu, M., *Electrophoresis*. 1997, 18, 2134–2144.
80. Horká, M., Kubíček, O., Růžicka, F., Holá, V., Malinovská, I., Šlais, K., *Journal of Chromatography A*. 2007, 1155 (2), 164–171, 10.1016/j.chroma.2007.02.026.
81. Horká, M., Růžicka, F., Horký, J., Holá, V., Šlais, K., *Journal of Chromatography B*. 2006, 841 (1-2), 152–159, 10.1016/j.jchromb.2006.05.013.
82. Shimura, K., *Electrophoresis*. 2009, 30 (1), 11–28, 10.1002/elps.200800615.
83. Anderson, C. L., Wang, Y., Rustandi, R. R., *Electrophoresis*. 2012, 33, 1538–1544.
84. Lupi, A., Viglio, S., Luisetti, M., Gorrini, M., Coni, P., Faa, G., Cetta, G., Iadarola, P., *Electrophoresis*. 2000, 21, 3318–3326.
85. Horká, M., Růžicka, F., Holá, V., Šlais, K., *Electrophoresis*. 2007, 28, 2300–2307.
86. Silvertand, L. H. H., Sastre Toraño, J., de Jong, G. J., van Bennekom, W. P., *Electrophoresis*. 2008, 29, 1985–1996.
87. Hjertén, S., *J. Chromatogr.* 1983, 270, 1–6.
88. Cohen, A. S., Karger, B. L., *J. Chromatogr.* 1987, 397, 409–417.
89. Vallejo-Cordoba, B., Rodríguez-Ramírez, R., González-Córdova, A. F., *Food Chem.* 2010, 120 (1), 304–307, 10.1016/j.foodchem.2009.09.080.
90. Lin, C., Cotton, F., Boutique, C., Dhermy, D., Vertongen, F., Gulbis, B., *J. Chromatogr. B*. 2000, 742, 411–419.
91. Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., Kang, C., *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2002, 23 (11), 1511–1512, 10.5012/bkcs.2002.23.11.1511.
92. Deng, X., Schröder, S., Redweik, S., Wätzig, H., *Electrophoresis*. 2011, 32, 1667–1674, 10.1002/elps.201000525.
93. Burnette, W. N., *Anal. Biochem.* 1981, 112, 195–203.
94. Widhalm, A., Schwer, C., Blaas, D., Kendler, E., *J. Chromatogr.* 1991, 549, 446–451.
95. Ganzler, K., Greve, K. S., Cohen, A. S., Karger, B. L., Guttman, A., Cooke, N., *Anal. Chem.* 1992, 64, 2665–2671.
96. Luo, S., Feng, J., Pang, H.-m., *J. Chromatogr. A*. 2004, 1051 (1-2), 131–134, 10.1016/j.chroma.2004.06.059.
97. Dextrane, <http://de.wikipedia.org/wiki/Dextrane>.
98. Beckman Coulter, Sicherheitsdatenblatt: *SDS-MW Gel-Puffer*.
-

-
99. Hasemann, P., ter Balk, M., Wätzig, H., *Electrophoresis*. 2007, 28, 1798–1804.
 100. El Deeb, S., Hasemann, P., Wätzig, H., *Electrophoresis*. 2008, 29, 3552–3562.
 101. Kašička, V., *Electrophoresis*. 2012, 33 (1), 48–73, 10.1002/elps.201100419.
 102. El Rassi, Z., *Electrophoresis*. 2010, 31, 174–191, 10.1002/elps.200900576.
 103. vfa - Die forschenden Pharma-Unternehmen, Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel 2013, www.vfa.de/gentech.
 104. Wärmelehre, in: Lüders, K., Pohl, R. O. (Eds.), *Pohls Einführung in die Physik: Band 1: Mechanik, Akustik und Wärmelehre*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2008, pp. 263–270.
 105. Herwig, H., Wärmeübertragung: *Physikalische Grundlagen, Illustrierende Beispiele, Übungsaufgaben mit Musterlösungen*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlag, GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, Wiesbaden 2006.
 106. Veraart, J. R., Gooijer, C., Lingemann, H., *Chromatographia*. 1997, 44 (3/4), 129–134.
 107. optris infrared thermometers, Mehr Präzision - Grundlagen der berührungslosen Temperaturmessung: *Infrarotthermometer und Infrarotkameras* 2006, <http://www.optris.de/downloads>.
 108. optris infrared thermometers, optris® CT LT/ 1M/ 2M/ 3M/ G5: *Infrarotsender*, Bedienungsanleitung, <http://www.optris.de/downloads>.
 109. Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis*. 2005, 26, 4333–4344.
 110. Knox, J. H., McCormack, K. A., *Chromatographia*. 1994, 38 (3/4), 215–221.
 111. Wätzig, H., Mehnert, W., Bühler, W., Mathematik und Statistik kompakt: *Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin ; mit 55 Tabellen*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 2009.
 112. Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H., Regressionsanalyse, in: Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H. (Eds.), *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik ; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*, Oldenbourg, München 2005, pp. 569–608.
 113. Wätzig, H., *Chromatographia*. 1992, 33 (9/10), 445–448.
 114. Patil, V. A., Narayanan, V., *Microfluid. Nanofluidics*. 2006, 2, 291–300.
 115. Franssila, S., Marttila, S., Kolari, K., Östman, P., Kotiaho, T., Kostianen, R., Lehtiniemi, R., Fager, C.-M., Manninen, J., *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2006, 15 (5), 1251–1259.
 116. Elektrizitätslehre, in: Böge, A., Eichler, J. (Eds.), *Physik für technische Berufe: Physikalisch-technische Grundlagen, Formelsammlung, Versuchsbeschreibungen*,

- Aufgaben mit ausführlichen Lösungen ; mit 35 Tabellen*, Vieweg + Teubner, Wiesbaden 2008, pp. 176–233.
117. Isono, T., *J. Chem. Eng. Data*. 1984, 29 (1), 45–52.
118. Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis*. 2006, 27, 672–676, 10.1002/elps.200500566.
119. Hruska, V., Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Gaš, B., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis*. 2009, 30, 910–920.
120. Patel, K. H., Evenhuis, C. J., Cherney, L. T., Krylov, S. N., *Electrophoresis*. 2012, 33 (6), 1079–1085, 10.1002/elps.201100417.
121. Evenhuis, C. J., Musheev, M. U., Krylov, S. N., *Anal Chem*. 2010, 82, 8398–8401.
122. Veraart, J. R., Lingemann, H., Gooijer, C., *Biomed. Chromatogr*. 1995, 9, 271–272.
123. Bansal, S. K., Layloff, T., Bush, E., Hamilton, M., Hankinson, E. A., Landy, J. S., Lowes, S., Nasr, M. M., St. Jean, P. A., Shah, V. P., *AAPS PharmSciTech*. 2004, 5 (1), Article 22.
124. Bedson, P., Sargent, M., *Accred Qual Assur*. 1996, 1, 265–274.
125. Cone, M., VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1), ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE 2007.
126. Bedson, P., Rudd, D., *Accred. Qual. Assur*. 1999, 4, 50–62.
127. Ross, G. A., *Accred. Qual. Assur*. 1997, 2 (6), 275–284.
128. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Agilent Capillary Electrophoresis System: *Operational Qualification / Performance Verification* 2000.
129. Kaminski, L., Aspekte des wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Dissertation, Braunschweig 2011.
130. Huber, L., Welebob, L., *Accred. Qual. Assur*. 1997, 2, 316–322.
131. Kaminski, L., Degenhardt, M., Ermer, J., Feußner, C., Höwer-Fritzen, H., Link, P., Renger, B., Tegtmeier, M., Wätzig, H., *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2010, 51 (3), 557–564, 10.1016/j.jpba.2009.09.011.
132. Baryl, N. E., Operational Qualification of a capillary electrophoresis instrument, in: Chan, C. C. (Ed.), *Analytical method validation and instrument performance verification*, Wiley, Hoboken, NJ 2004, pp. 187–195.
133. Puttock, B., Qualification of CE Instrumentation, in: Ahuja, S., Jimidar, M. I. (Eds.), *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*, Elsevier/AP, Amsterdam 2008, pp. 171–183.
134. Kunkel, A., Degenhardt, M., Schirm, B., Wätzig, H., *J. Chromatogr. A*. 1997, 768 (1), 17–27.
135. Baumann, K., Wätzig, H., *Process Control and Quality*. 1997, 10 (1-2), 59–73.
136. Baumann, K., *Process Contr Qual*. 1997, 10, 75–112.

-
137. Krivácsy, Z., Gelencsér, A., Hlavay, J., Kiss, G., Sárvári, Z., *J. Chromatogr. A.* 1999, 834, 21–44.
138. Koller, A., Wätzig, H., *Electrophoresis.* 2005, 26 (12), 2470–2475, 10.1002/elps.200500024.
139. Agilent Technologies, Hidden Costs and Undiscovered Opportunities in Analytical Instrument Qualification, 5989-7054EN 2011.
140. Capillary Electrophoresis, in: *The United States pharmacopeia, the national formulary: USP ; NF*, US Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, Md 1979-.
141. Wehrlé, P., Stamm, A., *Drug Dev Ind Pharm.* 1994, 20 (2), 141–164.
142. Bracht, K., *Pharmazeutische Zeitung.* 2009, 145 (12), 17–25.
143. Taverna, M., Tran, N. T., Ferrier, D., Separation of Protein Glycoforms by Capillary Electrophoresis, in: Thibault, P., Honda, S. (Eds.), *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*, Humana Press 2003, pp. 163–196.
144. Sheng, L., Pawliszyn, J., *Analyst.* 2002, 127 (9), 1159–1163, 10.1039/B206438C.
145. Šlais, K., Friedl, Z., *J. Chromatogr. A.* 1994, 661, 249–256.
146. Šlais, K., Friedl, Z., *J. Chromatogr. A.* 1995, 695, 113–122.
147. Mazanec, K., Šlais, K., Chmelík, J., *J. Mass. Spectrom.* 2006, 41, 1570–1577.
148. Shimura, K., Wang, Z., Matsumoto, H., Kasai, K.-i., *Electrophoresis.* 2000, 21, 603–610.
149. Shimura, K., Kamiya, K.-i., Matsumoto, H., Kasai, K.-i., *Anal. Chem.* 2002, 74 (5), 1046–1053, 10.1021/ac0108010.
150. Horká, M., Willmann, T., Blum, M., Nording, P., Friedl, Z., Šlais, K., *J. Chromatogr. A.* 2001, 916, 65–71.
151. Cohn, E. J., Strong, E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., Taylor, H. L., *J. Am. Chem. Soc.* 1946, 68 (3), 459–475.
152. Plasmafraktionierung, in: Bruchhausen, F. v., Hager, H. H. J. (Eds.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Springer, Berlin 1991, pp. 678–680.
153. Ahrends, R., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Hildebrand, D., Trusch, M., Schlüter, H., *J. Chromatogr. A.* 2009, doi:10.1016/j.chroma.2009.10.028, 10.1016/j.chroma.2009.10.028.
154. Sarioglu, H., Lottspeich, F., Walk, T., Jung, G., Eckerskorn, C., *Electrophoresis.* 2000, 21, 2209–2218.
155. Deng, X., Optimierung der quantitativen Gelelektrophorese die pharmazeutische Analytik, Dissertation, Braunschweig 2012.
156. 2.5.33 Gesamtprotein, in: *Europäisches Arzneibuch, Allgemeiner Teil, Monographiegruppen*, Dt. Apotheker-Verl, Stuttgart 2011.
-

157. Wenz, C., Performance of commercially available gels for protein characterization by capillary gel electrophoresis with UV detection on the Agilent 7100 CE System, 5990-7976EN 2011.
158. Huntington, J. A., Stein, P. E., *J. Chromatogr. B.* 2001, 756, 189–198.
159. Schaeper, J. P., Sepaniak, M. J., *Electrophoresis.* 2000, 21, 1421–1429.
160. Lee, H. G., *J. Immunol. Methods.* 2000, 234, 71–81.
161. Zhang, L., Yeung, B., Liu, J., *Am. Lab.* 2006, 38 (1), 34–37.
162. Schirm, B., Wätzig, H., *Chromatographia.* 1998, 48 (5/6), 331–346.
163. Dittami, S., Shapiro-Wilk Normality Test 2009, <http://dittami.gmxhome.de/shapiro/>.
164. Schepers, U., Ermer, J., Preu, L., Wätzig, H., *J. Chromatogr. B.* 2004, 810 (1), 111–118, 10.1016/j.jchromb.2004.07.023.
165. Li, J., *Anal. Chim. Acta.* 1999, 388, 187–199.
166. Snyder, L. R., Glajch, J. L., Kirkland, J. J., Practical HPLC method development, Wiley, New York, NY [u.a.] 1997.
167. Dolan, J. W., *LC GC Europe.* 2009, 27 (4), 306–312.
168. Baur, L., Jehle, H., Wätzig, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22 (3), 433–449.
169. Vollmar, A., Immunologie: *Grundlagen und Wirkstoffe*, WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2005.
170. UniProt Knowledgebase, <http://www.uniprot.org/>.
171. Sigma-Aldrich Katalog, www.sigmaaldrich.com.

10 Anhang

10.1 Temperaturmessung an der Kapillare

10.1.1 Matlab-Quellcode

10.1.1.1 *temperkenn*

Dieses Skript erkennt die Zahlen innerhalb eines Videos aus vorher festgelegten Bereichen.

```
function Temperatur3=temperkenn(s)
obj=mmreader(s); %Laden des Videos
rect=[316.556542444629 32.5897271146723 27.3580769521507 13.9620530652355];
rect2=[191.510000000000,54.5100000000000,30.9800000000000,15.9800000000000;
];
Temperatur=zeros((obj.NumberofFrames),4);
Strom=zeros((obj.NumberofFrames),5);
I2=logical([0 1 1 1 1 1 1 1 0]');
I3=logical([0 1 1 1 0 0 0 1 0]');
for f=1:obj.NumberofFrames
vidframes=read(obj,f); %lesen des ersten Frames
a1=rgb2gray(vidframes); %Umwandlung des Bildes in Graustufen
thresh=graythresh(a1); %Bestimmung eines Grenzwertes, zur
% Unterscheidung von Vorder- und
% Hintergrund
b=im2bw(a1,thresh); %Umwandlung in ein binäres Bild
% aufgrund des Grenzwertes
b=~b; %logical wird genau umgedreht, die
% Zahlen werden zu 1 und weiß
c=imcrop(b,rect); %Bildausschnitt wird festgelegt
c=imclearborder(c,4); %alle weißen Abschnitte, die die
% Ränder berühren, werden auf schwarz
% gesetzt
stats = regionprops(c,'Area','Orientation','Image');
%die Zahlen werden einzeln
% ausgewertet
for g=1:4
if g<= length(stats)
switch stats(g,1).Area
case 1
Temperatur(f,g)=double('.');
case 11
Temperatur(f,g)=double('1');
case 13
Temperatur(f,g)=double('7');
case 18
Temperatur(f,g)=double('4');
case 21
Temperatur(f,g)=double('8');
otherwise
```

```

        if stats(g).Area<18 && stats(g).Orientation<85 &&
            stats(g).Orientation>0
            Temperatur(f,g)=double('2');
        elseif stats(g).Area<18 && stats(g).Orientation>85
            Temperatur(f,g)=double('3');
        elseif stats(g).Area>18 && stats(g).Orientation>0
            Temperatur(f,g)=double('0');
        elseif stats(g).Area>18 && stats(g).Orientation>-85 &&
            stats(g).Orientation<0
            Temperatur(f,g)=double('5');
        elseif stats(g).Area>18 && stats(g).Orientation<-83
            I=imcrop(stats(g).Image,[0.5100    0.5100    0.9800
                                   8.9800]);
            if I==I2
                Temperatur(f,g)=double('6');
            elseif I==I3
                Temperatur(f,g)=double('9');
            else
                Temperatur(f,g)=NaN;
            end
        else
            Temperatur(f,g)=NaN;
        end
    end
end
else
    Temperatur(f,g)=NaN;
end
end

warning off all
    Temperatur1=char(Temperatur);
    Temperatur2=cellstr(Temperatur1);
    Temperatur3=str2double(Temperatur2);

end

```

10.1.1.2 Temperaturmessung

Funktion für die Auswertung von Temperaturmessdateien, die mit Hilfe des IR-Thermometers aufgenommen werden. Dieses Tool soll selbstständig die Messdaten für jeden Lauf ausschneiden, Mittelwert und Standardabweichung berechnen, dafür wird neben der Datei mit den Temperaturen, die Laufzeit und die gewünschte positive Steigung, die mindestens zur Erkennung erreicht werden muss, in der Funktion angegeben. Als Ergebnis werden v und w ausgegeben, die im Plot zeigen, welche Bereiche zur Berechnung genutzt werden. „Werte“ gibt den Mittelwert und die Standardabweichung der Temperaturmessung für die in v und w definierten Werte wieder.

```

function[v,w,werte]=Temperaturmessung(data,min,stei)
temp=[(1:length(data))' data(:,1)];
f=0; %Festlegung der
                                     Schleifenzählervariablen

t1=2;
Temperatur1=cell(length(temp(:,1))/(min*60),1);
while t1(1,1)>=1; %Abbrucheinstellung
x=temp(:,1); %Zeitachse
y=temp(:,2); %Temperaturvariable
fun1=fit(x,y,'pchipinterp'); %Erstellung einer Funktion im shape-
                               preserving modus

d1=differentiate(fun1,x); %Ableitung der Funktion fun1
k=d1>stei; %Logische Indizierung für alle
                               Steigungen kleiner als in der
                               Variablen stei festgelegt

t1=[x(k,1) y(k,1)]; %Variable mit den Zeiten für die
                               Steigung möglicher
                               Temperaturanstiege

if numel(t1)==0
break
end
f=f+1; %Schleifenzähler
s=[t1(1,1) (t1(1,1)+min*60)]; %Variable mit den Zeiten für die
                               Anfang und Ende der Spannung,
                               abhängig von min-Variable, die die
                               Dauer des Laufes enthält

k1=temp(:,1) >=s(1,1); %Schneiden
s2=temp(k1,:);
k1=s2(:,1)<=s(1,2);
s2=s2(k1,:);
Temperatur1(f,1)={s2}; %Bau einer Structure mit f als
                               variablen Namen

k2=temp(:,1)>s2(end,1);
temp=temp(k2,:); %Kürzen der Originaldatei
end
Temperatur=Temperatur1(1:f,:);
v=zeros((60*min+1),numel(Temperatur));
w=zeros((60*min+1),numel(Temperatur));
werte=zeros(numel(Temperatur),2);
for l=1:numel(Temperatur)
v(:,l)=Temperatur{1,1}(:,1);
w(:,l)=Temperatur{1,1}(:,2);
werte(l,1)=mean(Temperatur{1,1}(20:end,2));
werte(l,2)=std(Temperatur{1,1}(20:end,2));
end
end

```

10.1.1.3 Vergleich von linearen Zusammenhängen

Für die Nutzung des Skriptes Regressionstest.m werden die Matrizen „coeff“, „X“ und „y“ benötigt. „coeff“ enthält die Koeffizienten der linearen Regression, in der ersten Spalte die

Steigung, in der zweiten Spalte den y-Achsenabschnitt. „x“ und „y“ enthalten jeweils die Ausgangsdaten, also Leistung pro Länge und die Temperatur für die vier verschiedenen Kapillartypen. „stat“, „stat_t“ und „stat_ta“ enthalten die Ergebnisse der drei Tests, die durchgeführt wurden. Zuerst wurde eine F-Test (\rightarrow „stat“) berechnet. Daran schließen sich in diesem Fall zwei Welch-t-Tests an, zum einen für die Steigung (\rightarrow „stat_t“), zum anderen für den y-Achsenabschnitt (\rightarrow „stat_ta“). In den Tabellen steht eine „0“ für die Beibehaltung der Nullhypothese, eine „1“ steht für die Annahme der Alternativhypothese.

```
%Schätzung der Fehlervarianz
s_2=zeros(1,4);
for f=1:4
e=(y(:,f)-coeff(f,2)-coeff(f,1)*x(:,f));
e_2=e.^2;
n=sum(isfinite(e_2));
s_2(1,f)=(sum(e_2(1:n,1)))/(n-2);    %siehe Gleichung 21
end

%Schätzung der Varianzen des Achsenabschnittes und der Steigung
s_a2=zeros(1,4);                    %Achsenabschnitt
for f=1:4
n=sum(isfinite(x(:,f))));
x_sum=sum((x(1:n,f)-mean(x(1:n,f))).^2);
s_a2(1,f)=((1/n)+mean(x(1:n,f))^2)/x_sum*s_2(1,f);    %siehe Gleichung 22
end
sa2_sum=[s_a2(1) s_a2(1) s_a2(1) s_a2(2) s_a2(2) s_a2(3);s_a2(2) s_a2(3)
s_a2(4) s_a2(3) s_a2(4) s_a2(4)];

s_b2=zeros(1,4);                    %Steigung
for f=1:4
n=sum(isfinite(x(:,f))));
x_sum=sum((x(1:n,f)-mean(x(1:n,f))).^2);
s_b2(1,f)=(s_2(1,f)/x_sum);          %siehe Gleichung 23
end
sb2_sum=[s_b2(1) s_b2(1) s_b2(1) s_b2(2) s_b2(2) s_b2(3);s_b2(2) s_b2(3)
s_b2(4) s_b2(3) s_b2(4) s_b2(4)];

%F-Test
s=s_2.^0.5;
q=[s(1) s(1) s(1) s(2) s(2) s(3);s(2) s(3) s(4) s(3) s(4) s(4)];
F=NaN(1,6);
for f=1:6
if q(1,f)>q(2,f)
F(1,f)=(q(1,f)^2)/(q(2,f)^2);        %siehe Gleichung 24
elseif q(1,f)<q(2,f)
F(1,f)=(q(2,f)^2)/(q(1,f)^2);
else
F(1,f)=NaN;
end
end
n=sum(isfinite(x));
```

```

n_sum=[n(1) n(1) n(1) n(2) n(2) n(3);n(2) n(3) n(4) n(3) n(4) n(4)];
f_sum=n_sum-1;
P(1,1:6)=0.975;
F_test=finv(P,f_sum(1,:),f_sum(2,:));
stat=zeros(1,6);
for f=1:6
    if F(1,f)>F_test(1,f)
        stat(1,f)=1;
    elseif F(1,f)<F_test(1,f)
        stat(1,f)=0;
    else
        stat(1,f)=NaN;
    end
end

%Welch-test
x_stei=[coeff(1) coeff(1) coeff(1) coeff(2) coeff(2) coeff(3); coeff(2)
coeff(3) coeff(4) coeff(3) coeff(4) coeff(4)];
x_achse=[coeff(5) coeff(5) coeff(5) coeff(6) coeff(6) coeff(7); coeff(6)
coeff(7) coeff(8) coeff(7) coeff(8) coeff(8)];
t=zeros(1,6);
frei=zeros(1,6);
t_test=zeros(1,6);
stat_t=zeros(1,6);
for f=1:6;
    t(1,f)=(abs(x_stei(1,f)-x_stei(2,f))/sqrt((sb2_sum(1,f))/
n_sum(1,f)+(sb2_sum(2,f))/n_sum(2,f)))); %siehe Gleichung 25

    frei(1,f)=round (((sb2_sum(1,f)/n_sum(1,f)+sb2_sum(2,f)/n_sum(2,f))^2)/
(((sb2_sum(1,f)/n_sum(1,f))^2)/(n_sum(1,f)-1)+
(((sb2_sum(2,f))/n_sum(2,f))^2)/(n_sum(2,f)-1)))); %siehe Gleichung 26

    t_test(1,f)=tinv(0.975,frei(1,f));
    if t(1,f)>t_test(1,f)
        stat_t(1,f)=1;
    elseif t(1,f)<t_test(1,f)
        stat_t(1,f)=0;
    else
        stat_t(1,f)=NaN;
    end
end

ta=zeros(1,6);
freia=zeros(1,6);
t_testa=zeros(1,6);
stat_ta=zeros(1,6);
for f=1:6;
    ta(1,f)=(abs(x_achse(1,f)-x_achse(2,f))/
sqrt((sa2_sum(1,f))/n_sum(1,f)+(sa2_sum(2,f))/n_sum(2,f))));
    freia(1,f)=round (((sa2_sum(1,f)/n_sum(1,f)+sa2_sum(2,f)/n_sum(2,f))^2)/
(((sa2_sum(1,f)/n_sum(1,f))^2)/(n_sum(1,f)-1)+
(((sa2_sum(2,f))/n_sum(2,f))^2)/(n_sum(2,f)-1))));

```

```
t_testa(1,f)=tinv(0.975,freia(1,f));  
if ta(1,f)>t_testa(1,f)  
stat_ta(1,f)=1;  
elseif ta(1,f)<t_testa(1,f)  
stat_ta(1,f)=0;  
else  
stat_ta(1,f)=NaN;  
end  
end
```

10.2 Qualifizierung von analytischen Instrumenten – Ein Konzept für die Kapillarelektrophorese

10.2.1 Wellenlängenrichtigkeit

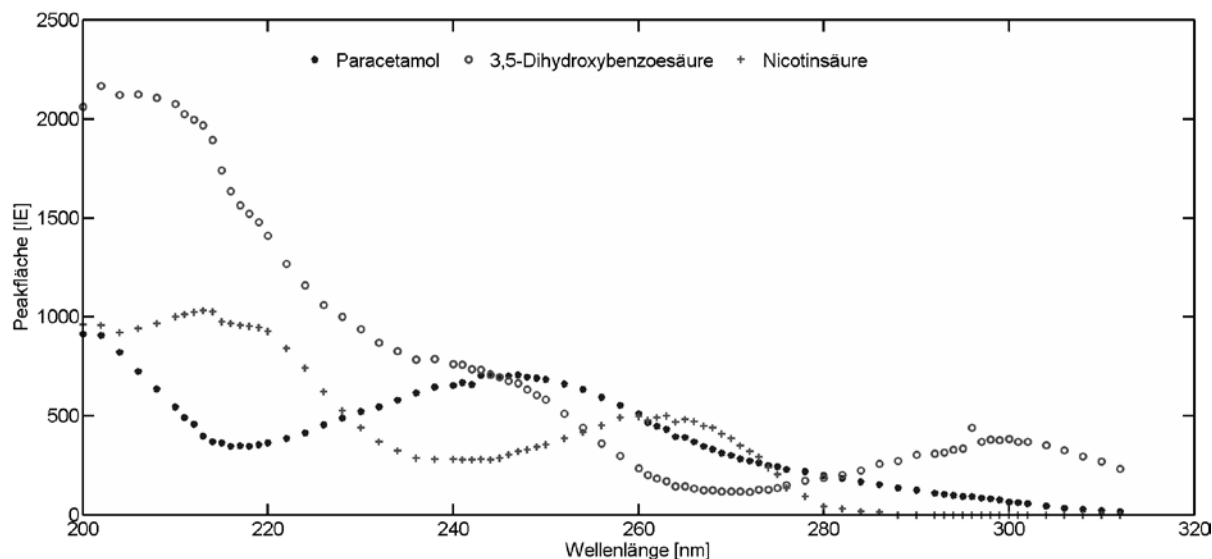


Abbildung 10-1: Prüfung auf Wellenlängenrichtigkeit des Spectra 100 UV-Detektor; Für jede Wellenlänge wurde ein Elektropherogramm mit der Gerätetestmethode (Kapitel 8.4.3.1) aufgenommen und die Peakflächen ausgewertet.

10.3 Kapillargelelektrophorese

10.3.1 Methodentransfer und -optimierung

Tabelle 10-1: Proteinmischung I, injiziert elektrokinetisch bei -5 kV für 20 sec (n=6)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	13,7	0,896	151	16,1
Carboanhydrase I	16,3	1,02	133	18,1
Ovalbumin	17,8	1,17	54,9	27,5
BSA	19,9	1,19	70,4	14,5

Tabelle 10-2: Proteinmischung I, injiziert elektrokinetisch bei -5 kV für 30 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,2	1,44	309	11,3
Carboanhydrase I	17,0	1,67	291	10,8

Ovalbumin	18,6	1,78	147	19,3
BSA	20,7	1,94	226	9,40

Tabelle 10-3: Proteinmischung II, injiziert hydrodynamisch mit 1 bar für 30 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,4	0,463	1180	7,25
Carboanhydrase I	17,1	0,528	686	9,88
Ovalbumin	18,5	0,577	1200	9,25
BSA	20,5	0,616	1730	11,8

Tabelle 10-4: Proteinmischung II, injiziert hydrodynamisch mit 1 bar für 60 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,5	0,288	2090	3,34
Carboanhydrase I	17,1	0,287	1250	2,82
Ovalbumin	18,6	0,292	2200	3,56
BSA	20,4	0,212	3190	3,58

Tabelle 10-5: Proteinmischung II, injiziert elektrokinetisch bei -10 kV für 20 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,7	0,820	340	4,46
Carboanhydrase I	17,5	0,948	151	5,26
Ovalbumin	19,0	1,02	196	10,9
BSA	21,3	1,11	294	3,17

Tabelle 10-6: Proteinmischung II, injiziert elektrokinetisch bei -10 kV für 30 sec (n=8)

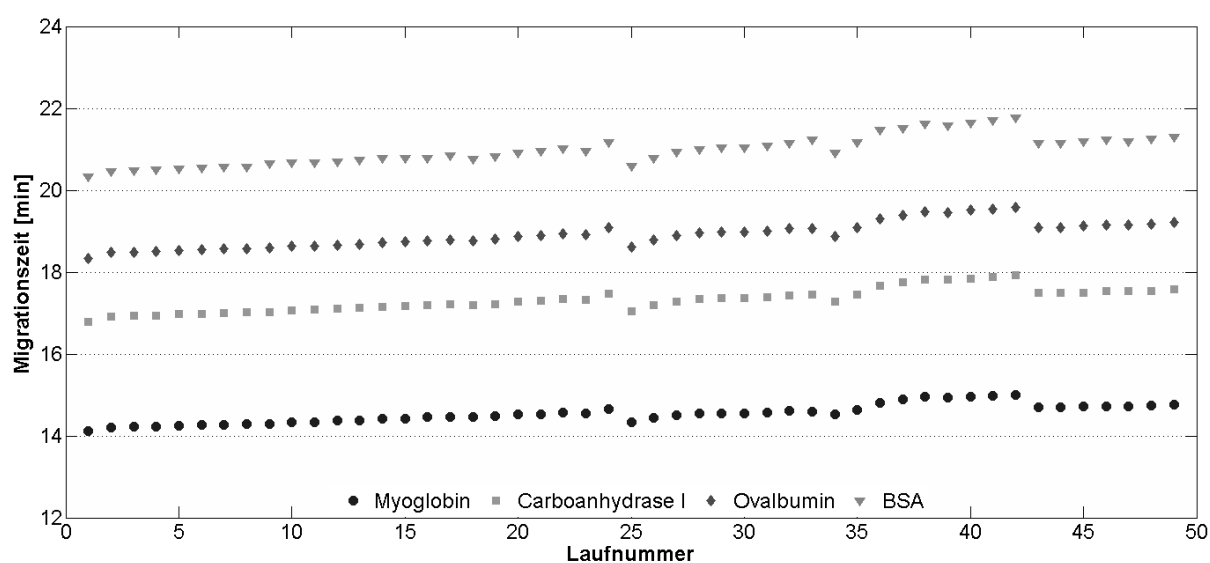
Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,7	0,239	542	4,29
Carboanhydrase I	17,5	0,274	253	1,81
Ovalbumin	19,1	0,282	346	6,15
BSA	21,3	0,315	490	2,94

Tabelle 10-7: Proteinmischung II, injiziert hydrodynamisch mit 50 mbar für 120 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,6	0,335	224	11,6
Carboanhydrase I	17,4	0,460	122	13,2
Ovalbumin	18,9	0,717	178	20,9
BSA	21,1	0,606	288	19,8

Tabelle 10-8: Proteinmischung II, injiziert hydrodynamisch mit 50 mbar für 240 sec (n=8)

Protein	Migrationszeit [min]		Peakfläche [mAU]	
	Mittelwert	RSD%	Mittelwert	RSD%
Myoglobin	14,6	0,069	427	3,18
Carboanhydrase I	17,3	0,061	224	6,23
Ovalbumin	18,9	0,176	306	9,58
BSA	21,0	0,047	487	10,86

**Abbildung 10-2:** Kontrollkarte über die Migrationszeit, elektrokinetische Injektion bei -10 kV für 30 sec (n=48)

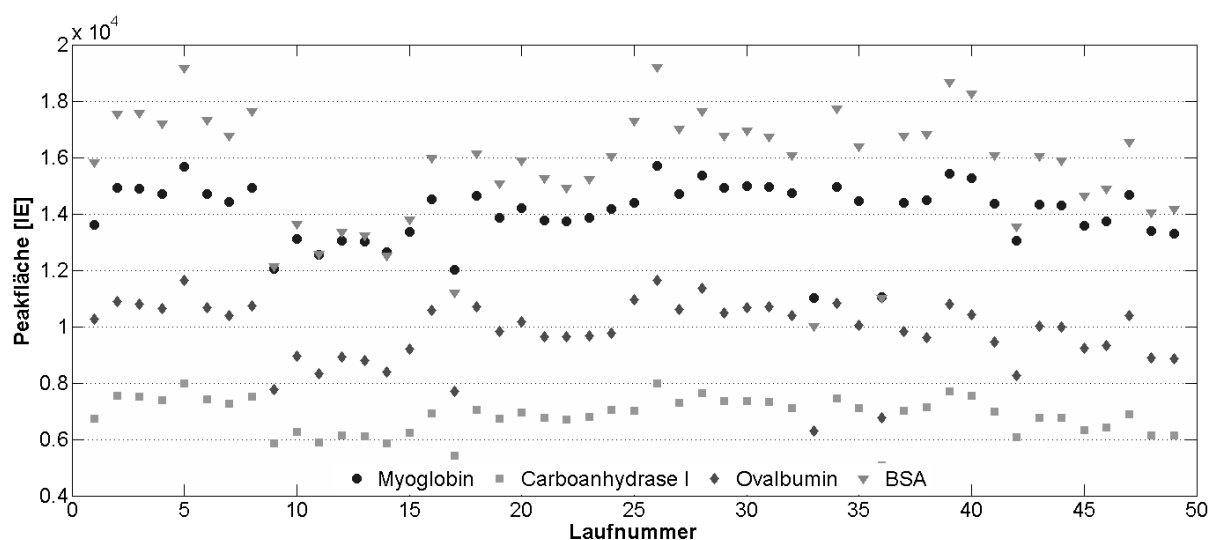


Abbildung 10-3: Kontrollkarte über die Peakfläche, elektrokinetische Injektion bei -10 kV für 30 sec (n=48)

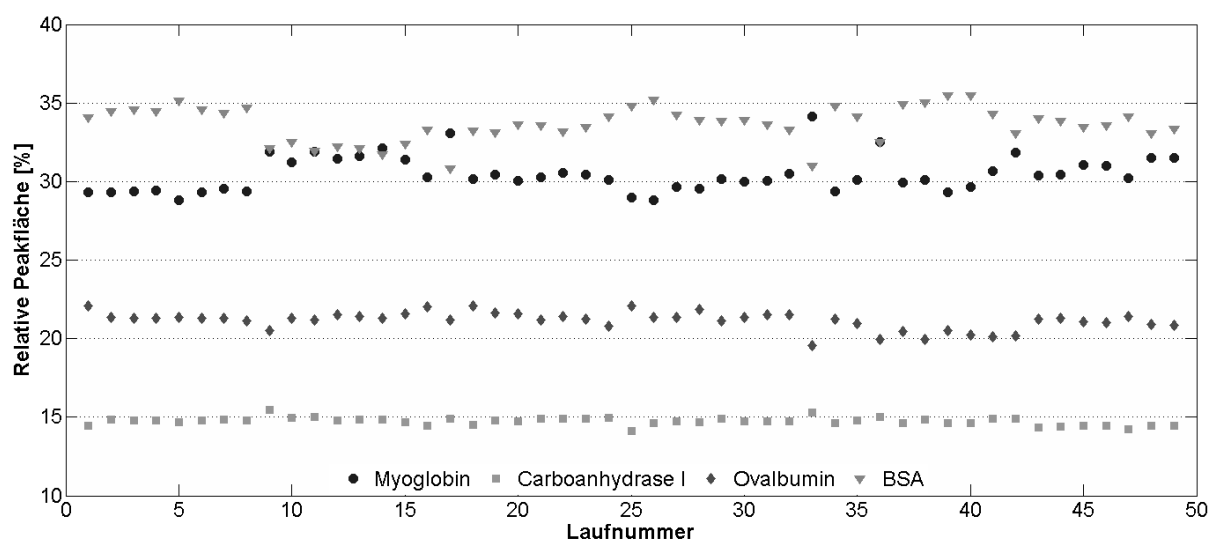


Abbildung 10-4: Kontrollkarte über die relative Peakfläche, elektrokinetische Injektion bei -10 kV für 30 sec (n=48)

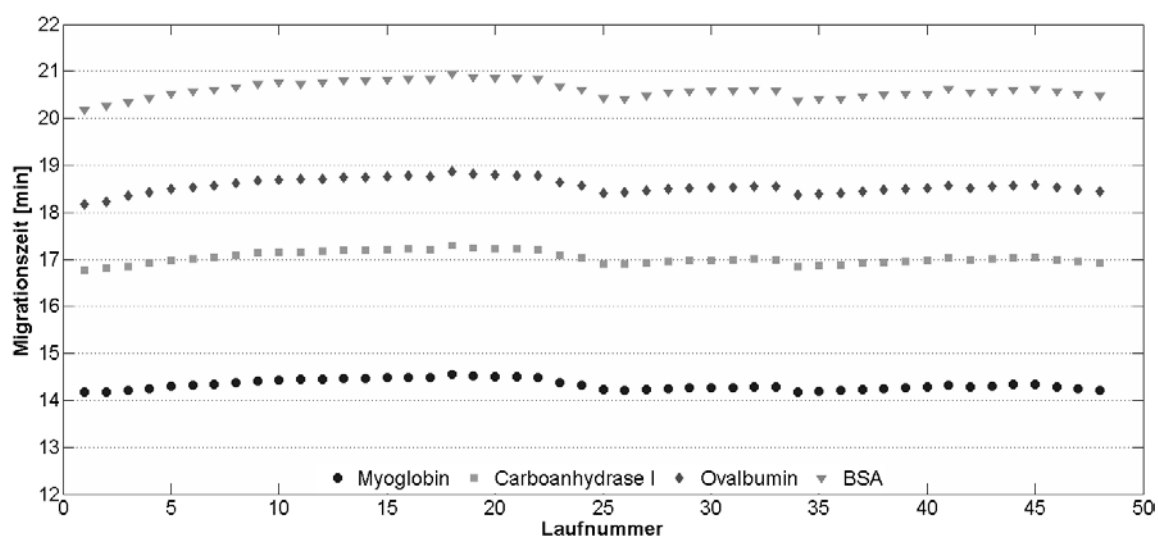


Abbildung 10-5: Kontrollkarte über die Migrationszeit, hydrodynamische Injektion bei 50 mbar für 240 sec (n=48)

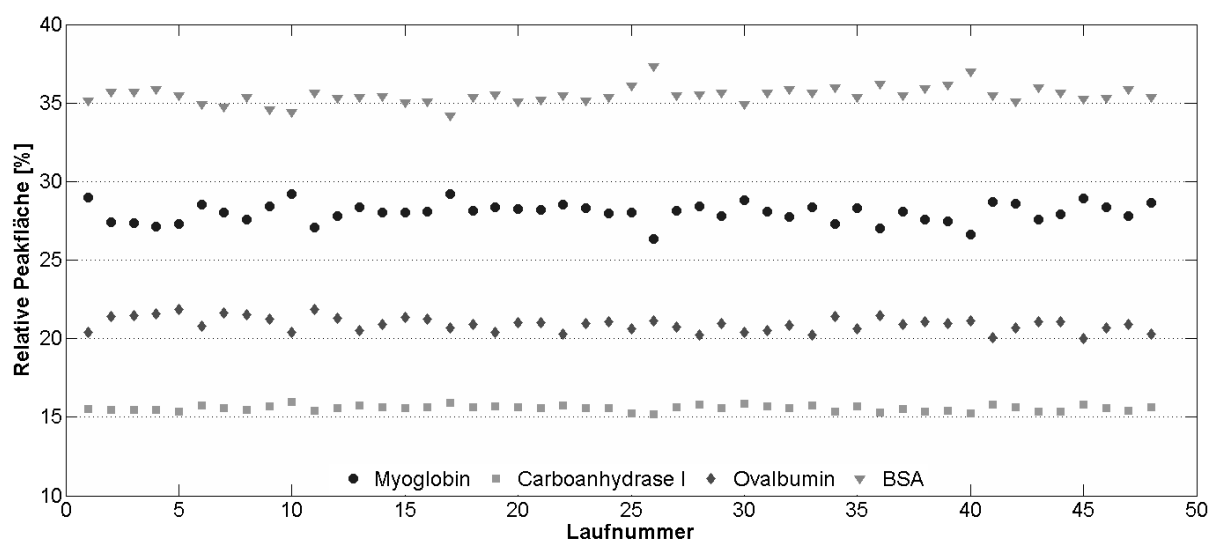


Abbildung 10-6: Kontrollkarte über die relative Peakflächen, hydrodynamische Injektion bei 50 mbar für 240 sec (n=48)

10.3.2 Vergleich von verschiedenen Injektionsarten

Tabelle 10-9: Shapiro-Wilk-Test nach [163] mit $p=0,10$

	Myoglobin	Carboanhydrase	Ovalbumin	BSA	Grenze
elektrokinetisch	0,9281	0,9603	0,9158	0,9602	0,954
hydrodynamisch	0,9751	0,9764	0,9748	0,9455	0,954

Wenn der Grenzwert unterschritten wird, so liegt wahrscheinlich keine Normalverteilung vor.

10.3.3 Abhängigkeit der Präzision vom Signal-Rausch-Verhältnis

Tabelle 10-10: Das Signal-Rausch-Verhältnis versus der relativen Standardabweichung [%] von CE-Peaks wird mit der Faustregel nach Dolan [167] und der Regression (beschrieben in Kapitel 6.5) verglichen.

[c] (mg/ml)*	S/N	RSD (%)	% RSD = 50 / (S/N)	% RSD = 73 / (S/N) + 1.07	[c] (mg/ml)*	S/N	RSD (%)	% RSD = 50 / (S/N)	% RSD = 73 / (S/N) + 1.07
Ovalbumin					BSA				
0,37	5,66	10,92	8,83	13,97	0,16	18,04	3,74	2,77	5,12
0,76	11,12	7,96	4,50	7,63	0,53	18,75	8,05	2,67	4,96
0,76	11,26	7,48	4,44	7,56	0,53	19,25	5,83	2,60	4,86
0,90	14,41	6,72	3,47	6,14	0,77	29,49	2,50	1,70	3,55
1,63	14,55	3,95	3,44	6,09	0,77	33,17	4,69	1,51	3,27
2,15	22,63	4,56	2,21	4,30	1,75	40,70	3,18	1,23	2,86
3,04	22,94	4,65	2,18	4,25	1,06	48,93	3,44	1,02	2,56
2,15	23,01	9,21	2,17	4,24	3,44	67,75	0,72	0,74	2,15
1,14	26,44	2,70	1,89	3,83	0,77	76,75	2,06	0,65	2,02
1,06	29,24	3,57	1,71	3,57	0,68	80,41	2,39	0,62	1,98
1,73	37,14	0,37	1,35	3,04	1,15	95,79	2,26	0,52	1,83
1,64	39,57	1,60	1,26	2,91	1,31	104,73	0,44	0,48	1,77
8,20	61,21	2,53	0,82	2,26	7,37	135,01	1,77	0,37	1,61
4,78	68,82	2,64	0,73	2,13	3,84	154,52	2,75	0,32	1,54
Carboanhydrase									
0,35	72,65	1,54	0,69	2,07					
0,35	102,08	2,68	0,49	1,79					
0,44	103,39	1,88	0,48	1,78					
2,72	109,78	0,94	0,46	1,73					
0,72	129,72	0,55	0,39	1,63					
0,63	138,06	1,15	0,36	1,60					
1,39	157,49	2,02	0,32	1,53					

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Claudia Filomena Cianciulli
Geburtsdatum	16.02.1985
Geburtsort	Hannover

Beruflicher Werdegang

10/2012 bis heute	Apothekerin bei Recipharm Wasserburger Arzneimittelwerk GmbH, Wasserburg a. Inn
01/2009 bis 08/2012	wissenschaftliche Mitarbeiterin für Forschung und Lehre, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig
08.12.2008	Approbation als Apothekerin
05/2008 - 10/2008	Zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung: Apotheke Am schwarzen Berge, Braunschweig
11/2007 - 04/2008	Erster Abschnitt der praktischen Ausbildung: Apotheke des Klinikums der Stadt Wolfsburg, Wolfsburg

Hochschulstudium

10/2003 - 09/2007	Pharmazie Technischen Universität Braunschweig, Braunschweig
-------------------	--

Schulausbildung

08/1997 – 06/2003	Gymnasium St. Ursula-Schule, Hannover
-------------------	---------------------------------------